5465
THESIS. AMSTERDAM. M24

DE QUANTITATIEVE BEPALING VAN UROBILINE EN UROBILINOGEEN IN URINE EN FAECES

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

A. J. L. TERWEN

LEESMUSEUM
AMSTERDAM
M

5765

DE QUANTITATIEVE BEPALING VAN UROBILINE EN UROBILINOGEEN IN URINE EN FAECES

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. R. C. BOER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN DE AULA DER UNIVERSITEIT OP WOENSDAG 2 JULI 1924, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR, DOOR

ADRIANUS JOHANNES LEONARDUS TERWEN, GEBOREN TE ALKMAAR

THESIS

UNIVERSITEITS-BOEKHANDEL, GRIMBURGWAL 11 AMSTERDAM

LEESMUSEUM AMSTERDAM

Si manes veterum per stirpis castra vagantur,
Tu, pater, adstes nunc; sit mea hora tua!

VOORREDE.

Deze, de eerste, bladzijde van een proefschrift heb ik mij altijd gedacht als een enkele bloem, neergelegd op een ruim voorzienen disch: een bijkomstigheid, ja, maar eene met een eigen sfeer, die men ongaarne zou missen. Zij toch is de plaats, waar wij, die van een volk zijn, dat niet gewoon is, zijn gevoelens op de tong te dragen, bij uitzondering eens mogen getuigen, dat wij hen, die bij onze studie onze leermeesters en helpers waren, in dankbaarheid gedenken. Helaas, van eenigen moet voor mij dit gedenken een herdenken heeten. Gij, Vader, die mijn hand (het was nog maar een kleine hand!) naamt, om mij in te leiden in de wereld van Odusseus en Aeneas, voor U was het zoo vanzelf sprekend, dat καλός *en* ἀγαδός *tot één adjectief werden samengetrokken; waarlijk, gij hebt mij bij Uwe lessen méér gegeven, dan de taal met hare vormen.*

Ook gij, LOBRY DE BRUYN, BAKHUIS ROOZEBOOM, PLACE, STRAUB, PEL, *gij allen hebt een leegte gelaten. Inzonderheid van U, hooggeëerde* PLACE, *scheidde ik met groote ontroering. Gij verstondt de kunst, ons jonge studenten met U op een hoogen berg te voeren, vanwaar wij mochten neerzien in een vallei van wonderen, die gij ons wist te duiden, maar zóó duiden, dat het wònder in verhevenheid àlmaar groeide. Uwe gewijde vereering voor Uwe voorgangers en het groote, dat zij gewrocht hadden, blijft mij een onvergetelijke herinnering.*

U, mijne leermeesters en oud-leermeesters, met vele van wie ik het voorrecht heb, op zoo prettige wijze in contact te zijn, U wil ik hier mijn oprechten dank betuigen voor alles, wat ik van U geleerd heb.

Zóó vele jaren reeds zijn het, RUITINGA, *mijn hooggeschatte promotor, dat ik Uw assistent ben en zóó snel zijn ze voorbijgegaan, dat het mij bij het bezinnen op het vele, dat ik daarin van U geleerd heb, te moede is als een wandelaar, die na een langen tocht bij een koelen dronk zijn mooien dag herdenkt. Niet het minste Uw beraden en evenwichtig oordeel over menschen en zaken was het, dat op mijn denken en handelen grooten invloed heeft gehad. Voor de onverstoorde geest van prettige samenwerking van U met Uwe assistenten schijnt gij een geheimzinnig recept te bezitten. Dat die geest voor ons beiden in al die jaren nooit verstoord werd, is een zóó zeldzaam en zóó gelukkig feit, dat ik daarvoor niet dankbaar genoeg kan zijn.*

Hooggeleerde ABDERHALDEN, *de maanden in Uw laboratorium te midden Uwer geestdriftige internationale schare doorgebracht, worden uit mijn herinnering nooit weggewischt.*

Hooggeachte SNAPPER, *zeergeleerde* GRÜNBAUM, *voor de gulle gastvrijheid, die gij mij in dien langen overgangstijd, toen mijn nieuwe laboratorium nog niet gereed was, in Uwe beperkte ruimten verleend hebt, ben ik U zeer erkentelijk.*

Ten slotte gij, mijne vrouwelijke assistenten en oud-assistenten! Uw werk, naar buiten zoo stil en van voorkomen zoo bescheiden, is in werkelijkheid van zóó groot gewicht, dat ik mij gelukkig moet prijzen, bij U steeds die toewijding, dat plichtsbesef, en — last not least — die opgewektheid gevonden te hebben, die het samenwerken met U tot een voorrecht maakten, dat ik altijd weer opnieuw waardeer.

INHOUD.

Blz.

Inleiding 1

De eigenschappen van het urobiline 4

De eigenschappen van het urobilinogeen 13

De quantitatieve bepaling van urobiline en urobilinogeen in de urine 25

De quantitatieve bepaling van urobiline en urobilinogeen in de faeces 52

Een nieuw urobiline-praeparaat en zijn eigenschappen . 64

Samenvatting 73

Litteratuur 76

INLEIDING.

In het jaar 1862 wees M. Jaffé, die toen nog student in de geneeskunde was, op de identiteit, die er blijkens een door hem ingesteld scheikundig onderzoek bestond tusschen de galkleurstof en de haematoidine, welke laatste stof hij in kristallijnen toestand afzonderde uit oude apoplectische haarden. Jaffé achtte hierdoor het aantal waarnemingen, die pleiten voor den ondergang van bloedcellen in de lever, met één vermeerderd. Tusschen de bloedkleurstof en de galkleurstof legde hij dus een genetisch verband.

Maly, die in 1871 in vitro bilirubine reduceerde tot een stof, hydrobilirubine, welke z.i. met het urobiline der urine van Jaffé en het stercobiline der faeces van Vanlair en Masius identiek was, wees op het sterke reductievermogen van den darminhoud, waardoor dáár uit galkleurstof urobiline ontstaat.

In de nu volgende jaren liggen eenige waarnemingen, die de urobilinurie in verband deden brengen met de resorptie van bloedextravasaten.

Kunkel meende in 1880, dat het urobiline, dat men bij bloedingen in de weefsels in de urine zag verschijnen, ter plaatse der bloeding zelve uit bilirubine ontstond.

Dick zag in 1884, dat in twee gevallen van buitenbaarmoederlijke zwangerschap en in één geval van haematocele retrouterina geelzucht optrad, evenwel zonder bilirubine, maar wèl met veel urobiline in de urine.

v. Bergmann wees op het menigvuldig voorko-

men van urobilinurie na schedeltraumata, resp. bloedingen in de hersenen.

In 1891 schreef Hoppe-Seyler, dat men in het urobiline een derivaat der galkleurstof en daarmede ook van de bloedkleurstof moet zien.

Degene evenwel, wien het duidelijk werd, dat de oudere onderzoekers te groote waarde aan de uitscheiding langs de nieren hadden toegekend en die scherp heeft geformuleerd, dat, wil men quantitatief door middel van de urobilineuitscheiding den bloedafbraak beoordeelen, men zijn aandacht vooral aan de bepaling dier stof in de ontlasting zal moeten besteden, was eerst veel later Eppinger.

Het was inmiddels telkens weer bevestigd, dat voor het tot stand komen der urobilinurie na een bloeding deze niet in het maagdarmkanaal, doch in de weefsels of in een lichaamsholte moet plaats vinden. En verder, dat ook bepaalde ziekten, die met het te gronde gaan van veel roode bloedlichaampjes gepaard gaan, tot het verschijnsel aanleiding geven, zoo b.v. de malaria, de paroxysmale haemoglobinurie en vooral de pernicieuze anaemie, de haemolytische icterus en de haemolytische anaemieën door vergiften.

Doordat nu evenwel de urobilinurie zoo uiterst veelvuldig ook bij allerlei andere ziekelijke afwijkingen voorkomt, ontstond sterk de behoefte, deze meestal lichtere vormen, die men b.v. ziet optreden bij koorts, bij obstipatie, in den honger en eenige uren na het gebruik van bepaalde spijzen, als rauwe eieren en rauw vleesch, te scheiden van de genoemde zwaardere vormen, door de hoeveelheid urobiline in een getal uit te drukken. Kon men zich hiertoe bij de urine desnoods nog behelpen met het schatten der intensiteit van de fluorescentieproef en de spectroscopische reactie, in de faeces was dit door de reeds normaal zoo groote hoeveelheid urobiline niet doenlijk.

Zoo ontstonden de quantitatieve bepalingen, het eerst opgezet voor de urine, eerst later voor de faeces, toen de belangstelling voor dien weg der uitscheiding gewekt was.

Niet alleen practisch van de zijde der kliniek, maar ook zuiver wetenschappelijk bekeken, kan voor de uiteindelijke be-

slissing van den strijd over ontstaan en lotgevallen van het urobiline in het organisme een goede quantitatieve bepaling dier stof in urine en faeces, bloed en gal, in lever, milt, nieren en weefsels, groote diensten bewijzen.

Onder den drang der kliniek, die mij cijfers vroeg over de urobilineuitscheiding in een geval van haemolytischen icterus, welke ik haar op grond der bestaande methoden niet of tenminste m.i. niet betrouwbaar, verschaffen kon, heb ik het vraagstuk der quantitatieve bepaling opgevat en voor urine en faeces methoden uitgewerkt, terwijl het bloed nog in bewerking is. Ik zal deze bespreken tegelijk met de oudere werkwijzen, kan dit evenwel niet zóó doen, dat het hoe en waarom dier werkwijzen duidelijk wordt, zonder een voorafgaande samenvatting der eigenschappen van het urobiline en zijn chromogeen, de kennis waarvan bij ons, artsen, blijkens mijn ervaring slechts zeer oppervlakkig is.

EERSTE HOOFDSTUK.

De eigenschappen van het urobiline.

In het jaar 1868 ontdekte Jaffé het urobiline. Bij zijn quantitatieve bepalingen van het kreatinine in de urine volgens de chloorzink-methode van Neubauer werd hij opmerkzaam op de fluorescentie, die het filtraat van het kreatinine-chloorzinkneerslag in sommige gevallen vertoonde. Hij isoleerde de stof, die dit verschijnsel veroorzaakte, zag, dat daarvoor een alkalische reactie van het alcoholische extract noodig was, wees op het spectroscopische gedrag der stof zelve en van hare zinkverbinding, merkte op, dat zij zich in de urine uit een kleurlooze moederstof vormde, vond haar ook in de gal en gaf haar ten slotte den naam, die haar afkomst uit de galkleurstoffen moest aanduiden. Met de ontdekking van het urobiline waren dus tegelijk zijn fundamenteele eigenschappen vastgelegd.

De ontdekking van het U. in de faeces is van Vanlair en Masius. Voorloopig werd die stof niet met het U. der urine geïdentificeerd en heette nog stercobiline.

In de nu volgende jaren ontstond er een vrij groote verwarring. Eenerzijds meenden sommigen gevonden te hebben, dat er in de urine verschillende soorten van U. kunnen voorkomen. Zoo onderscheidde Mac Munn het normale, het febriele of pathologische en het intermediaire U. Ook Eichholz pleitte voor een aparten pathologischen vorm van het U. Anderzijds trachtten anderen door reductie van dierlijke kleurstoffen tot hetzelfde U. te geraken. Zoo verkreeg Maly uit bilirubine en biliverdine door reductie met natriumamalgaam

het hydrobilirubine. Dezelfde reductie had Städeler reeds in 1864 uitgevoerd, maar deze had het eindproduct niet nader onderzocht.

Hoppe-Seyler reduceerde haematine en haemoglobine met tin en zoutzuur.

Nencki en Sieber deden hetzelfde met haematoporphyrine.

Garrod liet aldehyd inwerken op zuiver urochroom. F. Müller en later Ad. Schmidt, Beck, Esser, Fischler, Thomas reduceerden galkleurstof met bacterien tot U.

De fluorescentieproef en de absorptieband in het spectrum waren voor deze onderzoekers de kriteria voor het urobilinekarakter hunner eindproducten. Toch zag men wel in, dat men hier niet overal dezelfde stof in handen kon hebben. Maar dat de twee genoemde eigenschappen slechts groepreacties zijn, volstrekt niet alleen eigen aan het U. van urine en faeces, zou eerst veel later bewezen worden door Hans Fischer. Volgens hem zijn n.l. de niet-stabiele pyrrolen, d.w.z. die pyrrolen, die minstens één niet gesubstitueerd H-atoom aan een ring-C-atoom hebben, welke de fluorescentie der zinkverbinding en de absorptie in het blauwgroen vertoonen.

De moeilijkheid der oplossing van het identiteits-vraagstuk der urobilinen is daarin gelegen, dat het U. een bij uitstek labiele verbinding is. De sierlijke eenvoud van zijn twee typische reacties staat in scherpe tegenstelling tot de samengesteldheid van zijn isoleering in zuiveren staat. Er is letterlijk geen milieu te bedenken, waarin de stof geen gevaar loopt hare eigenschappen geheel of gedeeltelijk te verliezen. Vooral Wilbur en Addis hebben in deze richting feiten verzameld. Zij wijzen op het verlies aan stof, dat de extractie met aether of chloroform, het indampen, koud of warm, der oplossingen, het praecipiteeren veroorzaken. Ook de oxydatiemiddelen voor de omzetting van urobilinogeen in U., zooals jodium en kaliumpersulfaat en zelfs het diffuse daglicht, vernietigen een deel van het U. Charnas merkte op, dat reeds een paar maal oplossen der geïsoleerde stof in alcohol en weer indampen der vloeistof in vacuo een merkbaren invloed heeft op

de lichtabsorptie in den bekenden band van het spectrum. Van hem is ook de waarneming, dat het schudden der oplossing van de zuivere stof in aether met sterk zoutzuur of zwavelzuur een spektrumlooze roodviolette kleurstof doet ontstaan en dat door lang staan der waterige oplossing in het daglicht het U. vernietigd wordt. Garrod en Hopkins merkten op, dat door het indampen der aetherhoudende waterige oplossing en ook der oplossing in chloroform ontleding optreedt, zoodat na het indampen de stof niet meer geheel in alcohol oplosbaar is. Salkowski zag het U. uit de urine verdwijnen bij bewaren van deze, zonder dat de kleur der urine veranderde. Verhitte hij de urine twee uur in stroomenden damp, dan was al het U. in een andere gekleurde stof overgevoerd. Evenwel zou onder deze omstandigheden een zuivere U.-oplossing in water niet veranderen.

Hoppe-Seyler merkte op, dat in rottende urine het U. gereduceerd werd en dan later, bij oxydatie aan de lucht, een andere bruine kleurstof gaf.

Ik kan uit eigen ervaring de meeste dezer waarnemingen bevestigen; gevaarlijk is het indampen van de oplossing in chloroform in het daglicht, het behandelen der stof met warmen alcohol, het laten staan der oplossingen in het zonlicht, de aanraking met sterke minerale zuren. Spontaan verdwijnt het U. uit de urine, als men deze, met of zonder antisepticum (fluornatrium, salicylzuur), bewaart. De afname is van dag tot dag goed merkbaar, komt ook in het donker tot stand en voor het U. treedt dan een andere donkere kleurstof in de plaats.

De groote kwetsbaarheid van het U. molecule is een haast onoverkomelijk bezwaar, zoowel voor de afzondering als voor de quantitatieve bepaling. Want men mist de kriteria, die noodig zijn om uit te maken, of de bereide stof nog zuiver urobiline is en wel om de eenvoudige reden, dat men niet weet, wat zuiver urobiline is. Het ligt voor de hand hieronder te verstaan die stof, in onveranderden toestand geïsoleerd, die in geheel versche, niet belichte, urobilinerijke urines als zoogenaamd *natief urobiline* naast het urobilinogeen voorkomt. En nu belet juist de overgroote kwetsbaarheid der stof

haar afzondering in ongewijzigden staat. Men kan dus bij voorbeeld niet haar moleculair-gewicht, haar elementairanalyse, haar smeltpunt, de gevoeligheid van haar fluorescentieproef en van haar spectroscopische reactie, haar absorptieverhouding voor de spectrofotometrische bepaling vaststellen.

Waarborg, dat het dezelfde stof is, die door voorzichtige belichting onder zuurstoftoetreding uit het urobilinogeen van urine en faeces ontstaat, heeft men dus niet en nòg minder, dat dit natief U. met de uit bloed- en galkleurstof bereide „urobilinen" identiek is. Onze kennis, dat de twee hoofdeigenschappen van het U. groepreacties zijn, heeft de moeilijkheden van het probleem wel zeer verzwaard!

Charnas heeft na eenige vergeefsche pogingen om het U. zelf uit de urine in zuiveren toestand te isoleeren, van dezen directen weg afgezien en dien ingeslagen, die leidt over het geïsoleerde urobilinogeen, dat door belichting onder luchttoetreding geoxydeerd wordt. Hij kwam zoodoende tot een stof met een zeer hoog extinctie-vermogen in den absorptieband en meent daarom in die stof zeer zuiver U. te moeten zien. Maar het bewijs, dat zij met het natieve U. identiek was, leverde hij niet, terwijl het, streng genomen, ook niet vaststaat, dat uit de groep der „urobilinen" juist het natieve U. het hoogste extinctievermogen bezit en men dit laatste dus als kriterium van zuiverheid mag beschouwen, zooals C. doet.

Het U. is een amorf, niet hygroscopisch, roodbruin poeder; Kristallijn U. heeft men nog niet bereid. Laat men de oplossing in alcohol bij kamertemperatuur droogdampen, dan vertoont de aangedroogde samenhangende donkere massa een mooi groenen glans. De oplosbaarheid in water is slecht, ook als dit zuur reageert. Bij dezelfde concentratie is de waterige oplossing het donkerst bij zure, het lichtst bij alkalische reactie. Zeer verdunde oplossingen zijn rose, sterkere geel, nòg sterkere bruin. Het kleurend vermogen is evenwel niet groot te noemen en zelfs in urobilinerijke urines kan het aandeel, dat de stof aan de kleur dier urines heeft, niet aanzienlijk zijn. De donkere kleur, die zulke urines vaak vertoonen,

is aan andere begeleidende kleurstoffen toe te schrijven. Garrod en Hopkins zeggen ,dat een zure U. oplossing van de kleur van normale urine een zeer zwaren absorptieband bezit, terwijl een oplossing met een zwakken absorptieband, overeenkomend met een zwak positieve reactie in de urine, slechts een zeer zwak rose kleur vertoont.

De oplosbaarheid wordt verbeterd door aan het water een kleine hoeveelheid van een neutraal reageerend zout toe te voegen, terwijl geconcentreerde oplossingen daarvan juist de stof gaan uitzouten. Quantitatief, tenminste bij neutrale of zwak zure reactie, is dit het geval met het ammoniumsulfaat, waarmede men de vloeistof geheel moet verzadigen. (Méhu).

In mindere mate vertoonen deze eigenschap het natrium- en magnesiumsulfaat, nog minder de chloriden van Na, K en NH_4 en het kaliumsulfaat (Thomas blz. 26) De uitzouting door $(NH_4)_2\ SO_4$ wordt door de aanwezigheid van veel NH_4Cl gestoord.

Zeer goed oplosbaar is het U. in verdunde alkaliën en ammoniak, zoodat men het uit zulk een oplossing met zuren kan neerslaan.

Van de organische oplosmiddelen nemen methyl-, aethyl- en amylalcohol ook bij aanwezigheid van zuur het U. goed op. Goede solventia zijn verder aceton en chloroform, het laatste vooral, als men het door toevoegen van een weinig absol. alcohol in staat heeft gesteld een beetje HCl op te nemen (Ladage). In Frankrijk voegt men aan den chloroform nog 15% thymol toe. Evenals met azijnaether en dichloorhydrine kan men uit de waterige zure oplossing zoowel U. als zijn chromogeen met chloroform uitschudden, waaraan zij zich dan weer met alkalisch water laten onttrekken.

Goede oplosmiddelen zijn verder de aniline en de pyridine, matig goed is de azijnaether (Saillet). Een éénmalige extractie ermede onttrekt niet alle U. aan de waterige oplossing (Ladage).

Omgekeerd is het mogelijk, aan den azijnaether met water de kleurstof te ontnemen, wat met het urobilinogeen niet gelukt (Thomas).

De gewone aether is een poover oplosmiddel. Aan de zure waterige oplossing onttrekt hij slechts weinig U. Laat men het U. in den aether ontstaan door belichting van het daarin opgeloste chromogeen, dan lost er vrijwat U. op, maar dit wordt door schudden met water gemakkelijk weder aan de oplossing onttrokken. (Charnas)

Onoplosbaar is het U. in zwavelkoolstof, petroleumaether, ligroïne, benzol, toluol, xylol en paraffinum liquidum, waaraan ik hier nog den tetrachloorkoolstof toevoegen kan.

De oplossingen van het U. in organische oplosmiddelen fluoresceeren groen; de fluorescentie der alcoholische oplossing neemt door de bijvoeging van een zinkzout toe, de vloeistof is dan bij doorvallend licht rose.

De waterige oplossing van het U. zelf fluoresceert niet, behalve somtijds, en dan zwak, bij alkalische reactie. Voor de prachtige groene fluorescentie der zinkverbinding werd door Jaffé een alkalische reactie voorgeschreven; vooral een ammoniakale oplossing van U. zink toont het verschijnsel fraai. Bij een neutrale of zeer zwak azijnzure reactie blijft het bestaan. Adler geeft zelfs op, dat het optimum ligt tusschen een P_H van 5.58 en één van 5.9, dus vrij ver naar den zuren kant. Een sterk zure oplossing fluoresceert niet. Hammarsten zegt, dat de fluorescentie door de aanwezigheid van andere kleurstoffen gestoord wordt. Ook kan in de urine storing intreden, wanneer deze geconcentreerd en sterk zuur is. Dan moet men NH_3 toevoegen.

Het urobilinezink is in verdunden alcohol slecht oplosbaar. Dit bemerkt men goed, als men de reactie van Schlesinger uitvoert met een waterige oplossing van gereinigd U. Of deze oplossing neutraal reageert, of wel zwak zuur door azijnzuur, of zwak alkalisch door ammoniak, steeds blijft een deel van het roode U. zink op het filter liggen en de doorgeloopen vloeistof vertoont wel een duidelijke, maar volstrekt geen sterke fluorescentie. Of men ook voor de urine met de mogelijkheid van gedeeltelijk neerslaan der verbinding rekening houden moet, is mij niet bekend.

De gevoeligheid der fluorescentieproef werd door Schlesinger zelf met 1:50.000 aangeduid. Fischler bevestigt

dit getal, onder voorwaarde, dat men, om de gevoeligheid zoo groot mogelijk te maken, met een lens in een donkere kamer een bundel zonlicht in de vloeistof laat vallen. Gautier en Monod en ook Grigaut geven aanwijzingen omtrent de techniek der belichting. Adler construeert hiervoor een apart zwart kistje, met gaten in het deksel voor de buisjes en met één open zijwand, waardoor men naar de buisjes ziet, die van boven af belicht worden. Hij geeft ook een geheel andere grens voor de gevoeligheid der fluorescentieproef, bepaald met behulp van een door H. Fischer bereid praeparaat van urobilinogeen, n.l. van 0.085 mgr. op 100 cc. vloeistof, d.i. dus 25 x zoo hoog als Schlesinger aangaf. Ook voor het later te bespreken hemibilirubine wordt door Fischer zelf deze grens, n.l. 1:1280000, aangegeven.

Met het door mij door belichting van een urobilinogeen-oplossing in petr. aether gewonnen praeparaat (zie 5de hoofdstuk) vond ik een nog zeer veel hoogere grens, n.l. 1:10 millioen. Gezien de groote kwetsbaarheid van het U. molecule, is het wel waarschijnlijk, dat zoowel Schlesinger als Adler met reeds veranderd U. hebben gewerkt. De opgave van den laatsten, dat zijn U. niet onmiddellijk geheel in alcohol oploste, wijst hier op.

De fluorescentieproef wordt steeds als aanzienlijk gevoeliger aangegeven dan de spectroscopische reactie op den absorptieband van het U. zink. Ik kan dit niet bevestigen: bij het zooeven door mij genoemde praeparaat lagen de grenzen hetzelfde, wanneer voor de spectroscopische reactie een laagdikte van 3 c.M. genomen werd. Bij de beschrijving van dit praeparaat kom ik hierop later nog terug.

Over de spectroscopische eigenschappen van het U. kan ik kort zijn. De beschrijving der verschillende spectra vindt men bij Garrod en Hopkins. Ik herinner er alleen aan, dat de bekende absorptieband in het blauwgroen eenigzins van plaats wisselt, afhankelijk van den aard van het oplosmiddel, van de reactie der oplossing en van den vorm, waarin het U. aanwezig is, als U. zelf of als zinkverbinding. Zoo ligt de absorptieband eener waterige U. oplossing:

bij neutrale of zure reactie bij: 480—501,

bij alkalische reactie bij: 500—510,
terwijl die der oplossing van het U. zink ligt:
bij neutrale reactie bij: 498—514,
„ ammoniakale reactie bij: 497—519.

Zuurt men een zwak alkalische oplossing van zuiver U. voorzichtig aan met zeer verdund zoutzuur, dan komt er een oogenblik, dat de vloeistof zwak opalescent wordt. Op dat moment is er een tweede band te zien, de z.g. *E-band* van Garrod en Hopkins, onafhankelijk van hen iets later ook beschreven door Saillet, die ligt bij 535 en door een schaduw met den zuren band verbonden is.

De gevoeligheid der spectroscopische reactie is voor het U. zèlf in alkalische oplossing belangrijk kleiner dan in zure of neutrale; 't geringst is zij in ammoniakaal milieu. Dit geldt niet voor de oplossing van het U. zink, dat ook bij ammoniakale reactie een zeer gevoelig spectrum bezit.

Saillet geeft als grens der gevoeligheid van de spectroscopische reactie der zure alcoholische oplossing een concentratie van 0.045%, als men de laagdikte 1.5 c.M. neemt. Dit getal is m.i. niet juist; werkelijk zuiver U. verdraagt een veel grootere verdunning.

In Neubauer - Huppert's Analyse des Harns bespreekt Schulz de kleurstoffen, die door hun spectrum meer of minder tot verwarring met het U. aanleiding kunnen geven: choleteline, bilicyanine, uroerythrine.

Hoewel de waterige oplossing van het U. neutraal reageert, gedraagt de stof zich toch als een uiterst zwak zuur. Men kan er verschillende metaalverbindingen van bereiden. De alkalizouten zijn gemakkelijk oplosbaar, het NH_4 zout verliest bij het droogdampen der oplossing zijn ammoniak. De aardalkalizouten en de zouten der zware metalen bereidt men door de alkali-resp. NH_4-verbinding samen te brengen met een zout van het bedoelde metaal. Het roode hydrargyrizout is bekend uit de sublimaatproef van Schmidt op het U. der faeces; het is oplosbaar in NH_3 (Goiffon). Het cuprizout, evenals het nikkel- en het cobaltzout in NH_3 oplosbaar, geeft in alkalische oplossing de bekende roodviolette „biureetreactie" van het U., het eerst beschreven door Stok-

vis, (J. de Hartogh Jr. diss.) Volgens Bogomolow lost het met een karmijnroode kleur in chloroform op.

Verder noem ik nog de zinkverbinding, die door alkaliën en het mangaanzout en de ijzerzouten, die door glycerine in oplossing gehouden worden. (Denigès). De loodzouten en het zilverzout zijn onoplosbaar; met zilvernitraat of met loodacetaat, hetzij neutraal of basisch, kan men het U. neerslaan. Met baryumzouten gelukt dit alleen in geconcentreerde U. oplossingen. Hierin onderscheidt de stof zich van het haematoporphyrine, waarvan de Ba-verbinding zelfs in kokend water zeer slecht oplost.
Volgens Méhu en ook Rabuteau (geciteerd naar Schulz) reduceert het U. in alkalische oplossing CuO tot Cu_2O.

De reductie van het U. tot het urobilinogeen zal ik in het volgende hoofdstuk behandelen.

Voor de kliniek is het nog van belang te weten, dat het uraatneerslag der urine behalve uroerythrine ook U. adsorbeert, dat men bij een quant. bepaling dit neerslag dus eerst moet oplossen. Het urobilinogeen daarentegen hecht zich volgens Thomas niet aan het neerslag.

TWEEDE HOOFDSTUK.

De eigenschappen van het urobilinogeen.

De kleurlooze moederstof van het urobiline, die de twee meest kenmerkende eigenschappen van deze, de fluorescentie der zinkverbinding en den absorptieband in het groen, nog mist, was niettemin aan den scherpen blik van den ontdekker van het U., Jaffé, niet ontgaan. Hij merkte op, dat veelal urines aan licht en lucht donkerder werden en dan de U. reacties in sterkeren graad gaven. Bij deze waarneming bleef het tot 1878, toen Disqué in zijn opstel „Uber Urobilin" ook aan het chromogeen aandacht schonk, het „urobiline réduite" noemde, de oplosbaarheid in chloroform vond en aantoonde, dat een zure reactie de omzetting in urobiline bevorderde. Nog was de belangstelling in de stof niet groot, daar pas in 1888 Riva en Zoja weder iets kwamen mededeelen, n.l. de oplosbaarheid in verschillende solventia, waarna het wederom 10 jaren, tot 1897, duurde, vóórdat Saillet zijn aandacht aan het U.-geen, dat hij met dien naam doopte, wijdde. Hij vond, dat voor de omzetting in U. weliswaar zuurstof noodig is, maar dat het proces zonder licht zeer langzaam verloopt en door het licht zeer veel versneld wordt, waarbij hij nog een vergelijking maakte tusschen de verschillende kleuren van het licht en de violette stralen het meest werkzaam vond. Voorts ging S. den invloed van de reactie der vloeistof op de snelheid der omzetting na en kwam daarbij tot de volgende volgorde: zoutzuur, zwavelzuur, azijnzuur, alkaliën, ammoniak, neutrale oplossing. Evenwel stonden zeer verdunde ($N/_{100}$) oplossingen van zuren of alkaliën vrijwel gelijk met neutrale. Later heeft Thomas deze proeven overgedaan en in hoofd-

zaak bevestigd, toen, na het bekend worden der Ehrlich'sche aldehyd-reactie, het aantoonen ook van kleine hoeveelheden U. geen zooveel gemakkelijker geworden was.

Men kan de zuurstof der lucht ook door oxydeerende middelen vervangen. De joodtinctuur, die wij hiervoor nog steeds bij voorkeur gebruiken, is reeds in 1887 door Engel en Kiener aangegeven, later ook door Ladage, Gerhardt en door Steensma gebruikt. Riva en Zoja gebruikten salpeterzuur, Bauer waterstofsuperoxyd, Hausmann kopersulfaat, Wilbur en Addis ammoniumpersulfaat.

De omzetting in U. wordt door verwarmen der vloeistof niet sterk beïnvloed. Thomas kookte de neutrale waterige oplossing gedurende 3 uur aan den terugvloeikoeler zonder merkbaren invloed op de sterkte der aldehydreactie. Ook verdroeg de droge stof de verhitting op 110° C. gedurende eenige uren goed.

Evenals het U. is het U.-geen in water slecht oplosbaar, zeer goed daarentegen, als men dit alkalisch maakt, zoodat men het ook uit deze laatste oplossing met zuren kan neerslaan.

Zeer goed is de oplosbaarheid in de alcoholen en in chloroform, goed in aether, azijnaether, dichloorhydrine en tetrachloorkoolstof, weinig in zwavelkoolstof, slecht (Charnas) in benzol en xylol. In paraffine lost de stof niet op. Aceton, aniline en pyridine zijn niet te gebruiken, daar zij met het U.-geen tot gekleurde verbindingen reageeren. (Thomas).

Met amylalcohol, chloroform, tetrachloorkoolstof, aether, azijnaether, petrol. aether of chloorhydrine kan men het U. geen uit de zure waterige oplossing schudden. Alkalisch water ontneemt de stof weder aan de oplossing in aether, petrol. aether of tetrachloorkoolstof.

Aan de oplossing in azijnaether kan men met water wèl het U., maar niet het U.-geen ontnemen. De scheiding is echter niet quantitatief. *Hèt middel ter scheiding van U. en U. geen is m.i. de petroleumaether*, die U. in het geheel niet, U.geen vrij goed oplost. Ook haematoporphyrine, dat overigens moeilijk van beide lichamen te scheiden is, lost in petr.

aether niet op; hoe evenwel zijn chromogeen zich gedraagt, is mij niet bekend.

Over het uitzouten van het U.geen d.m.v. neutrale zouten geldt hetzelfde als voor het U. zelf. Charnas zegt, dat het ammoniumsulfaat de stof alleen uit een azijnzuur milieu niet quantitatief neerslaat. Volgens Eichholz kan men uit het amm. sulf.-neerslag het U.-geen met alcohol extraheeren.

Over het mede-neerslaan van het U.geen met in de vloeistof opgewekte praecipitaten is niet veel bekend. Thomas geeft op, dat Ba-zouten U.-geen in het geheel niet, U. zelf alleen uit geconcentreerde oplossingen neerslaan. Een calciumneerslag, in de urine opgewekt met $CaCl_2$ + NaOH, houdt volgens hem een deel van het U.geen vast, evenals een praecipitaat van calciumoxalaat. Het uraatneerslag bindt wel U., maar geen U.geen. Over het al of niet neerslaan met loodacetaat loopen de meeningen uiteen. Terwijl Borngträger en Hammarsten mededeelen, dat 't U.geen zich, in tegenstelling met het U. zelf, niet door loodacetaat laat neerslaan en Thomas dit zoowel voor neutraal als voor basisch loodacetaat bevestigt, zegt Charnas nadrukkelijk, dat het U.geen zich met bas. loodacetaat uit zure of neutrale urine quantitatief laat praecipiteeren. Aan het neerslag kon hij de stof met azijnzuren alcohol onttrekken.

De diffusie-snelheid van het U.-geen door dierlijke membranen is door Achard en Morfaux onderzocht. Zij vonden, dat in een urine, die U., U.geen, bilirubine en indican bevatte, het U.geen in 6, het indican in 8, het U.in 22 en het bilirubine in 30—35 minuten buiten de membraan aantoonbaar waren. Beyers heeft van de grootere diffundeerbaarheid van het U. gebruik gemaakt om deze stof van het bilirubine te scheiden. Dat het U.geen een kleiner molecule heeft dan het U. is ook de opvatting van Wilbur en Addis, die uit 2 mol. U.geen 1 mol U. laten ontstaan.

Terwijl wij in licht en lucht een eenvoudig hulpmiddel hebben voor de omzetting van het U.geen in zijn dochterstof, is de omgekeerde weg, *de reductie van het U. tot U.geen*, alles behalve eenvoudig gebleken.

Eichholz kreeg met natriumamalgaam onvolledige re-

ductie. Charnas, die de quantitatieve bepaling van de som van beide stoffen het eerst wilde leiden over het U.geen, had een goed reductiemiddel noodig. Hij vond, dat in het algemeen bij zure reactie een te ver gaande reductie niet te vermijden was, b.v. bij de reductie met zinkstof en zoutzuur. Onbruikbaar waren zwaveligzuur en hydrazinhydraat. Een wisselend resultaat gaven joodwaterstofzuur, joodphosphonium alsmede het brengen van natrium in de absoluut-alcoholische oplossing van het U. Van de chemische reducties gaf hem nog het beste resultaat die, *waarbij de heete oplossing van U. in Na HCO_3 met natriumamalgaam gereduceerd wordt in in een stroom van koolzuur, om het ontstaande alkali te neutraliseeren.* Toch duurde dan 't proces nog uren en was nog onvolledig, zoodat C. zijn toevlucht moest nemen tot een *biologische reductie*, n.l. die met bacteriën.

Grootere belangstelling kreeg men voor het U.geen eerst na Juli 1903, toen O. Neubauer mededeelde, dat de in 1901 door Ehrlich beschreven roodkleuring, die sommige urines met paradimethylamidobenzaldehyd en zoutzuur vertoonen, aan U.-geen te danken is, wat Pappenheim in Maart van dat jaar reeds als vermoeden had geuit. Het reagens was op het laboratorium van Ehrlich reeds sinds de mededeelingen van E. Fischer in 1887 in gebruik voor het aantoonen van indol (phenylpyrrol) en zijn derivaten en men wist dat 1 mol. aldehyd met 2 mol. indolderivaat reageerde tot rood gekleurde stoffen, door Ehrlich rosindolen genoemd naar analogie der rosanilinen (triphenylmethaanderivaten). Het oude Ehrlich'sche voorschrift voor *de aldehydreactie in de urine* luidde:

„Voeg bij eenige cc. urine eenige druppels eener 2% oplossing van het aldehyd in 20% HCl en voeg, als de reactie niet snel komt, nog wat geconcentreerd HCl. toe" Die volle Intensität der Reaktion erhält man erst beim Aufkochen, wenngleich manche Harne auch schon in der Kälte sich deutlich röten".

Neubauer nu zag bij het bewaren van urine, die geen U. spectrum, maar wel sterke aldehydreactie vertoonde, deze laatste zwakker worden parallel met het optreden van den

absorpieband. Hij onderzocht ook andere derivaten van de bloedkleurstof en ook van het chlorophyl en vond, dat haematine, haemine, haematoporphyrine en urobiline zelf niet reageeren, wèl het U.geen, het met zink en zoutzuur gereduceerde haematine of haematoporphyrine en ook het haemopyrrol (methyl-propyl-pyrrol).

Ehrlich was tot de reactie gekomen op grond der overweging, dat de aldehydgroep een zeer reactief radicaal is en juist het dimethylamidobenzaldehyd een in de kleurstoftechniek bekende stof was (de $-N(CH_3)_2$ groep heeft auxochrome eigenschappen). Inderdaad bleek de aldehydgroep de reageerende te zijn, want brengt men in de urine tevoren een ander alifatisch of aromatisch aldehyd, b.v. formaldehyd of benzaldehyd, dan mislukt daarna de reactie, omdat nu de bewuste plaats „bezet" is. Om deze reden is dan ook na het gebruik van urotropine de E. reactie in de urine onzeker in haar resultaat. (Skelenz).

Het mechanisme der Ehrlich'sche aldehydreactie is dus de condensatie van het urobilinogeen, dat een pyrrolderivaat is, met het aldehyd. Reeds in 1902 had Feist, zonder daarbij eenigzins het oog te hebben op het U.geen, in het algemeen de condensatie van pyrrolen met aromatische aldehyden bestudeerd. Hij vond, dat het aldehyd met twee ÇH groepen, elk van een pyrrolring, reageert, zoodat dipyrryl-arylmethaanderivaten ontstaan. Dit zijn ongekleurde lichamen, die, zooals Feist later na een desbetreffende vraag van H. Fischer vond, secundair door oxydatie in de eigenlijke kleurstoffen overgaan. Volgens F. kunnen slechts die pyrrolderivaten gecondenseerd worden, die nog minstens één aan koolstof gebonden kernwaterstofatoom bezitten, waarbij het onverschillig is, of aan de N van den pyrrolring waterstof of alkyl gebonden is. Zijn alle vier de H.-atomen aan de C.-atomen van den ring gesubstitueerd, dan is de condensatie met het aldehyd niet meer mogelijk, ook al is de imidogroep intact. Terloops zij hier opgemerkt, dat deze zelfde pyrrolen, die zich met aldehyd laten condenseeren, na hunne oxydatie een fluoresceerende zinkverbinding geven, zich dus als U.geen resp. urobiline gedragen.

Hoe nu bij de E. aldehydreactie het U.geen van urine en faeces reageert, of hier 2 mol U.geen zich ieder met één CH-groep of wel 1 mol. U.-geen met 2 zulke groepen aan 1 mol. aldehyd vastleggen, is niet met zekerheid uitgemaakt. H. Fischer en F. Meyer-Betz meenen uit hun onderzoek te mogen besluiten, dat de ontstane kleurstof een dipyrryl-phenyl-methaanderivaat is, dat secundair uit de bijbehoorende leukobase ontstaat.

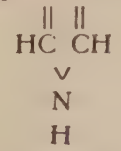
Voor het tot stand komen der aldehydreactie zijn behalve zoutzuur, ook andere minerale zuren te gebruiken, evenwel geen organische. De kleurstof, die ontstaat, is bestudeerd door Rohde, Kimura, Bauer en Thomas. De eerste zegt onbegrijpelijkerwijze, dat zij twee absorptiebanden zou bezitten, n.l. bij 615—570 en een onduidelijken band bij 555—540. Hans Fischer geeft voor de alcohol. opl. van het U.-geen uit urine 572—532 en 496—475, waarvan de 2e band door ontleding komt. (urobiline). Charnas noemt in zijn latere mededeelingen nog slechts 550—570. Ikzelf vind bij de later te bespreken voorzichtige wijze van uitvoering der E. reactie in de waterige azijnzure oplossing slechts één absorptieband, met vage begrenzing naar links en rechts en reikend van 515—590 in geconcentreerde oplossing, terwijl in verdunde oplossingen de band 't laatst te zien is in de streek 555—570. Dit is ongeveer dezelfde plaats, als ingenomen wordt door de kleurstof, die bij de aldehydreactie van het indol onstaat (v. Moracewski).

De paarsroode kleur der vloeistof verdwijnt onmiddellijk door de reactie alkalisch te maken en keert, ten minste als men niet te lang wacht, door aanzuren der vloeistof weer terug. Zij is niet bestand tegen het zonlicht. (Prüscher).

Uit de waterige oplossing kan men de kleurstof met epichloorhydrine of dichloorhydrine, met amylalcohol of chloroform uitschudden. Thomas vond, dat men haar uit de zure oplossing kan uitzouten met ammonium- of natriumsulfaat, minder goed met magnesiumsulfaat of kaliumchloride. De uitgezoute kleurstof is zeer goed oplosbaar in water, absol. alcohol, azijnaether, amylalcohol, chloroform, dichloorhydrine, pyridine, ijsazijn; goed oplosbaar in me-

thylalcohol, aceton, aniline, O-toluidine, phenol; onoplosbaar in aether, petrol. aether, zwavelkoolstof, benzol, xylol, aethyleenbromide, paraffine. Thomas kon de kleurstof neerslaan met pikrinezuur als een amorf bruin praecipitaat, dat met een granaatroode kleur in amylalcohol oploste. Ook reduceerde hij de kleurstof met zink + zoutzuur tot een kleurlooze verbinding, waaruit hij met HNO_3 + HNO_2 of $KMnO_4$ de kleurstof kon regenereeren. De gereduceerde kleurstof was in alkali oplosbaar en, in tegenstelling met de kleurstof zelve, in dien vorm vrij bestendig.

In het jaar 1911 heeft H. Fischer door reductie van bilirubine met behulp van natriumamalgaam, een stof bereid, die hij *hemibilirubine* en later *mesobilirubinogeen* genoemd heeft. Kenmerkend voor deze stof was, dat hij haar zoowel uit de alkalische als uit de zure oplossing met chloroform kon uitschudden, wat hare isoleering vergemakkelijkte. Hij kon de stof kristallijn verkrijgen, door haar uit de oplossing in azijnaether met ligroïne neer te slaan. Een kristallografische analyse werd uitgevoerd. Hoewel licht en lucht een snelle oxydatie bewerkten, eerst tot een oranje, later tot een roode kleurstof, is het hem toch gelukt bij de elementairanalyse vrij constante uitkomsten te verkrijgen, die de formule $C_{16}H_{20}N_2O_3$ waarschijnlijk maakten, terwijl het moleculairgewicht, vastgesteld aan de oplossing der stof in naphtaline, op 460 werd bepaald, wat intusschen met de genoemde formule, die 288 geeft, allerminst klopt. F. vermoedde, dat hij in het hemibilirubine te maken had met het anhydride van het zuur: $H_3C\text{-}C\text{-}C\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COOH$.



Door de oxydatie der stof en de analyse der daarbij verkregen producten kon hij dit aannemelijk maken.

Het smeltpunt der stof was 192° C. (onder ontleding). Voor de oplosbaarheid geeft F. op: onoplosbaar in natr. bicarb., zeer moeilijk in azijnaether, benzol, ligroïne, petr.

aether, aether, water.Gemakkelijk oplosbaar in ammoniak, geconc. zoutzuur, alcohol, chloroform en naphtaline.

Met natronloog en kopersulfaat ontstaat een intensieve roodkleuring. De „Fichtenspanreaktion" of pyrrolreactie, is sterk positief, evenals de beide reacties van Ehrlich, de aldehydreactie en de eidooierreactie.

De groote belangrijkheid van dit onderzoek van H. Fischer kwam eerst voor den dag, toen hij tesamen met F. Meyer-Betz erin slaagde, uit U.-geen-rijke urine een kristallijne stof te isoleeren, die hij met het hemibilirubine meende te mogen identificeeren. Bij de afzondering kwam hun de eigenschap der laatste stof, zich uit een bicarbonaat-alkalische oplossing met chloroform te laten uitschudden, zeer te pas, omdat de storende verontreiniging met galzuren zoodoende vermeden werd. De analyse der kristallen, die niet zoo volledig uitgevoerd werd als die van het hemibilirubine zelf, wees op identiteit der twee stoffen. Het smeltpunt was 187° C, de N bepaling gaf 9.87 en 9.77 % (hemibilirubine 9.65%), De hoeveelheid stof was te klein voor een volledige elementairanalyse.

In een latere mededeeling, te zamen met Paul Meyer komt Fischer met eenige aanvullingen, deels ook correcties van zijn vroeger onderzoek over hemibilirubine. Zoo noemt hij die stof nu oplosbaar in natr. bicarbonaat, wat zij in de eerste mededeeling niet was. Verder leert hij nu twee bestaansvormen der stof kennen, een „zure" en een „niet-zure". De laatste is de modificatie, die zich alkalisch met chloroform laat uitschudden. Zij is het oorspronkelijk geïsoleerde kristallijne h.b.r. en heeft het smeltpunt 186°-190°C.

De eerste vorm, de „zure", laat zich aan de bicarb. alkal. vloeistof onttrekken, als deze éérst met chloroform geheel is ontdaan van den „niet zuren" vorm, dàn aangezuurd en opnieuw met chloroform geëxtraheerd wordt. Het smeltpunt is 140°—160° C onscherp. Lost men den „zuren" vorm op in natr. bicarb. oplossing, dan ontwikkelt hij, in tegenstelling met den „niet-zuren" vorm, koolzuur. Met chloroform kan men aan deze alkalische oplossing nu opnieuw een kleine hoeveelheid der „niet-zure" modificatie onttrekken en dit

geheele proces opnieuw herhalen. Beide modificaties hebben dezelfde elementaire samenstelling.

Door deze ingewikkelde verhoudingen is de vergelijking met het U.geen der urine er niet eenvoudiger op geworden. Of deze stof eveneens in de twee modificaties voorkomt, is door F. niet nagegaan. —

Van het zuivere h.b.r. hebben Fischer en P. Meyer opnieuw het moleculairgewicht en de elementaire samenstelling bepaald. Hun resultaten zijn eenigszins afwijkend van het eerste onderzoek. Het moleculairgewicht,ditmaal in alcohol bepaald, bedroeg nu n.l. 585 resp. 565, terwijl de elementairanalyse de keuze gaf tusschen de twee formules:

$$(C_{16}H_{22}N_2O_3)^2 \text{ en } C_{33}H_{44}N_4O_6$$

Voorts bereidden zij een cuprizout van het h.b.r., dat oplosbaar in water, chloroform, pyridine, onoplosbaar in alcohol en in ligroïne was. De oplossing (0.024%)in chloroform had in een laagdikte van 10 m.M. de absorptiebanden 660—636 (intens), 603—580 (zeer zwak) en 535—478 (intens). In de oplossing in NaOH verschuiven de banden iets naar rechts. Ook uit het h.b.r. uit pathol. urines konden zij een koperzout bereiden met dezelfde spectroscopische eigenschappen.

De paarse kleurstof, die bij de aldehydreactie van het h.b.r. (uit bilirubine bereid) ontstaat, is door Fischer en Meyer-Betz geïsoleerd. Zij voerden de condensatie uit in absoluut-alcoholische oplossing onder toevoeging van sterk zwavelzuur. De kleurstof werd met chloroform uitgeschud en door verdampen van dezen gewonnen. Een analyse ervan werd niet gedaan, zeker wel, omdat geen waarborg voor zuiverheid bestond. Een oplossing der kleurstof van 1:100.000 was nog sterk gekleurd en gaf twee absorptiebanden, 588—566 en 503-483. De oplossing bevatte evenwel waarschijnlijk nog veel leukoverbinding, daar een oplossing van zuivere h.b.r., waarmede direct, dus zonder isoleeren der kleurstof, de aldehydreactie uitgevoerd werd, een veel intensiever kleur gaf, zoodat zelfs een oplossing van 1:640.000 nog zwak rood was.

Interessant is ook, dat de reactie van Schlesinger,

uitgevoerd met een oplossing van het h.b.r., deze stof nog in een verdunning van 1 : 1280000 duidelijk aantoonde.

Door de bereiding van het kristallijne hemibilirubine, uit bilirubine en de afzondering van een ermee identiek verklaarde stof uit de urine, is de eenheid van het urobilinogeen der urine nog niet bewezen. Want de werkwijze, die in staat was gebleken het h.b.r. uit te schudden, n.l. de chloroformextractie der bicarbonaat-alkalische oplossing, gaf, toegepast op de urine, slechts een klein deel van het U.geen in het extract, welk deel voor de bereiding van het kristallijne U.geen resp. hemibilirubine der urine diende. Het grootste deel der stof bleef in de waterige vloeistof achter. Was dit deel nu tóch hemibilirubine? Fischer laat ons hieromtrent in het onzekere. Toch is dit van groot belang, want wij treffen hier wederom dezelfde vraag aan als bij het urobiline zelf: komt er slechts één, of komen er meerdere urobilinogenen in de urine voor? en voorts: is het U.geen der urine hetzelfde als dat der faeces?

Wanneer wij urobilinogeen noemen die stof, die door oxydatie overgaat in urobiline en die de Ehrlich'sche aldehydreactie geeft, dan wordt de naam die van een soort van stoffen en niet van een chemisch individu. Want 1° is urobiline, zooals wij op blz. 5 zagen, een soortbegrip en 2° is de aldehydreactie een groepreactie. Het is dus noodig, nieuwe kenmerken aan te geven, om binnen deze groep één individu te definieeren. Hier is ons arsenaal slecht voorzien. Men zou kunnen letten op de meer of minder gemakkelijke oxydeerbaarheid, op verschil in oplosbaarheid in de organische solventia, op de biureetreactie met het absorptie spectrum van het cuprizout, op de eidooierreactie van Ehrlich. Het onderzoek wordt in hooge mate bemoeilijkt door de karigheid, waarmede het materiaal beschikbaar is, door de subtiele werkwijzen en vooral door de groote gevoeligheid der stof (stoffen?) voor oxydatie, die de zoo belangrijke elementairanalyse minder zeker maakt. Voegen we hier nog bij, dat de bepaling van het moleculairgewicht bij een zoo groot molecule niet met nauwkeurigheid geschieden kan en dat het smeltpunt door ontleding onscherp is, dan is het begrij-

pelijk, dat het dwingende bewijs, dat men met identieke stoffen en niet met onderling veel op elkaar gelijkende leden eener zelfde groep te maken heeft, zeer moeilijk te leveren is.

Aan O. Neubauer, die, gelijk wij zagen, de aldehydreactie met het U.geen in verband bracht, stond de mogelijkheid van het voorkomen van meerdere U.genen tegelijk in de urine reeds duidelijk voor oogen: „Es ist klar, dass beim Uebergang des Haemopyrrol $C_8H_{13}N$ in Urobilin $C_{32}H_{40}N_4O_7$ eine Reihe von Zwischenprodukten mit steigendem O-Gehalt entstehen muss, welche alle die Eigenschaft haben, in Urobilin überzugehen und also als Urobilinogen bezeichnet werden müssen. Welche dieser Urobilinogene im Harn vorkommen, ist noch festzustellen, jedenfalls sind es verschiedene Stufen; denn man kann die Beobachtung machen, dass in manchen Harnen die Reaktion schon in der Kälte auftritt, in anderen erst beim Erwärmen (l.c. blz. 35)".

Een opmerking van H. Fischer maant ons evenwel met betrekking tot het laatste argument tot voorzichtigheid. Hij zegt n.l. dat de aldehydreactie der normale urine zeker niet alleen op U.geen berust, maar ook op een indolderivaat, dat met waterdamp over te distilleeren is, maar zich dáárin van alle pyrrolen, die met het aldehyd reageeren, onderscheidt, dat de gekleurde reactievloeistof geen absorptieband in het groen bezit. Verder brengt hij het eerst in de warmte intreden der E. reactie in verband met het daardoor afsplitsen van zijketens van den pyrrolring. Of het hemibilirubine het eenige U.geen der urine is, blijft ook voor hem een onuitgemaakte zaak.

Behalve de „aldehydreactie" hebben wij nog een tweede reactie op urobilinogeen in eerste instantie aan Ehrlich te danken. Dit is de z.g. primaire diazoreactie of *eidooierreactie*. Hij verstond hieronder de oranjegele verkleuring, die men in de urine bij de toevoeging van het diazoreagens (sulfodiazobenzol uit sulfanielzuur + zoutzuur + $NaNO_2$) ziet optreden, zonder dat er nog ammoniak toegevoegd is. De ontstane kleur kan zeer donker zijn, waarbij zich het schuim oranje kleurt. Ammoniak doet de kleur in meer zwavelgeel overgaan. Ehr-

lich meende reeds, dat de reactie aan een galkleurstofderivaat te danken was, maar eerst Thomas bewees, dat overal, waar het U.geen voorkomt, ook in extracten der faeces dus, de reactie positief is, dat deze dus zeer waarschijnlijk aan die stof te danken is. Karakteristiek voor de reactie is volgens hem slechts de primaire oranje verkleuring, niet de secundaire zwavelgele. Gebruikt men azijnaether voor de extractie van het U.geen, dan gaan daarin, behalve die stof, b.v. ook de aromatische oxyzuren over, die bij zure reactie een niet storende lichtgele azokleurstof, bij alkalische evenwel een intensief roode verkleuring geven, die het zwavelgeel der secundaire diazoreactie van het U.geen geheel kan maskeeren.

Verder heeft Thomas nog getracht de primaire verkleuring meer opvallend te maken, door in plaats van sulfanielzuur andere stoffen te diazoteeren tot verbindingen, die met het urobilinogeen een meer roode kleur gaven. Dit gelukte hem met het aniline, dat een kersroode en het benzidine, dat een bloedroode verkleuring gaf. Met deze middelen kon hij aantoonen, dat eenige stoffen, die met het U.geen de E.sche aldehydreactie gemeen hadden (reductieproducten van haemine en haematoporphyrine, haemopyrrol, α α dimethylpyrrolazijnzuur) eveneens de aan die stof eigen primaire diazoreactie vertoonden. Over de toepassing dezer belangrijke wijziging der eidooierreactie op het onderzoek der urine schrijft Thomas niets en ook elders vond ik daaromtrent niets vermeld. Kleine bijdragen over de eidooierreactie vindt men nog bij Oppenheim, Petri en Clemens.

In de kliniek heeft de eidooierreactie geen burgerrecht kunnen verkrijgen. Dit is begrijpelijk, omdat het optreden der gele kleur in de gele urine moeilijk te zien is en bovendien de reactie niet zoo gevoelig is als de aldehydreactie of de proef van Schlesinger.

In het 3de hoofdstuk zullen wij evenwel zien, dat wij in de extractie van het U.geen met petroleumaether een middel bezitten, om ook de eidooierreactie voor de kliniek bruikbaar te maken.

DERDE HOOFDSTUK.

De quantitatieve bepaling van urobiline en urobilinogeen in de urine.

Tusschen de ontdekking van het U. en de eerste poging tot quantitatieve bepaling ervan liggen 20 jaren. In het jaar 1889 n.l. deelden F. Müller en D. Gerhardt hun methode mede, die hierop neerkomt, dat men na reiniging der urine met baryt in het filtraat het urobiline bij duidelijk zure reactie door volledige verzadiging met ammoniumsulfaat neerslaat, het praecipitaat warm met zwavelzuurhoudenden alcohol-aether uittrekt en in het extract het U. spectrofotometrisch bepaalt, waarbij als standaard-vergelijkingsstof het hydrobilirubine van Maly dient.

Hoppe-Seyler meende deze werkwijze te kunnen bekorten, door het ammoniumsulfaat direct aan de niet-vóórbehandelde urine toe te voegen; ten onrechte echter, daar op deze wijze ook het haematoporphyrine neergeslagen en mede bepaald wordt. Deze stof blijft bij de methode van M. en G., evenals de galkleurstof, in het baryt-neerslag hangen, welk feit evenwel toen nog niet bekend was. De verdere bewerking van H.S. is eenigszins anders: het ammoniumsulfaatneerslag wordt met een mengsel van gelijke deelen alcohol en chloroform uitgetrokken en uit dit extract de alcohol met water uitgeschud, waarna de chloroform verdampt wordt en het terugblijvende U., na nog met aether gereinigd te zijn, gewogen wordt.

Eenvoudiger trachtte Viglezio de bepaling uit te voe-

ren: het alcoholextract van het amm. sulf. neerslag laat hij langzaam bij een alcoholische, ammoniakale oplossing van chloorzink vloeien en let nu op, welke hoeveelheid hij noodig heeft: 1e om de fluorescentie en 2e om den absorptieband van het U.-zink te kunnen zien. Een 0.01% oplossing van Jaffé's urobiline diende daarbij ter vergelijking.

Saillet, die het eerst het U.geen uit de urine isoleerde en bestudeerde, leverde tegelijk ook de methode, om in de urine U. + U.geen quantitatief te bepalen. Hij zuurt de urine aan met salpeterzuur om het U.geen in U. om te zetten, welke stof hij dan extraheert met azijnaether, waaraan hij haar opnieuw onttrekt met ammoniakaal water. Deze waterige oplossing wordt aangezuurd met HCl en zóó lang verdund, totdat de absorptieband van het zure U.-spectrum nog juist zichtbaar is („spectre minimum"). Dit is het geval bij een concentratie van 0.00682%, als de laagdikte 10 m.M. bedraagt (of wel 1 mgr. U. per 22 c.M.^{3} vloeistof bij een laagdikte van 15 m.M.)

Door onzen landgenoot A. A. Ladage werden in Saillet's methode eenige wijzigingen gebracht: hij extraheerde met zoutzuurhoudenden chloroform inplaats van azijnaether, vergemakkelijkte de extractie door de urine bij azijnzure reactie met ammoniumsulfaat te verzadigen en oxydeerde met jodiumtinctuur in plaats van met salpeterzuur. De bepaling geschiedde ten slotte als bij Saillet door verdunnen met absol. alcohol tot het „spectre minimum".

Saillet was tot zijn methode gekomen op het voetspoor van Vierordt, die het eerst voorsloeg het U.-gehalte van een oplossing spectrofotometrisch te bepalen. Anderen, die den absorptieband voor de quantitatieve bepaling gebruikten, waren Henocque en Hayem en Winter (geciteerd naar Ladage).

Aan pogingen, om de fluorescentie der zinkverbinding voor de bepaling te gebruiken, heeft het evenmin ontbroken. Grimm maakte een aether- of chloroformextract der zure urine, dampte dit in, loste de rest op in verdunden ammoniak en eenige druppels chloorzinkoplossing en verdunde de vloeistof zóó lang, als hij de fluorescentie nog kon waarnemen,

Toen Schlesinger zijn bekende, eenvoudige wijze van uitvoering der oude fluorescentieproef van Jaffé aangaf, lag het voor de hand, dat ook hij probeerde, om door verdunning van het reactie-product tot de fluorescentiegrens een inzicht in de hoeveelheid U. te verkrijgen. Volgens hem ligt, zooals wij in het eerste hoofdstuk reeds zagen, deze grens bij een concentratie van 0.002%. Dat dit getal niet juist kan zijn, en dat die grens bij een zeer veel sterkere verdunning ligt, leze men na op blz. 10.

In den laatsten tijd heeft Adler nog eens getracht de verdunningsmethode te volmaken. Belangrijk is zijn voorstel, om als verdunningsvloeistof van het Schlesinger-filtraat niet te nemen water en ook niet alcohol of gefiltreerd reagens van S., maar een 10% oplossing van zinkacetaat in gelijke deelen water en absol. alcohol. Hij neemt dus 10 c.M³. urine + 10 c.M.³ absol. alcohol + 1 gram zinkacetaat + 3 druppels 3% joodtinctuur en schudt goed door. Het filtraat wordt met de zooeven genoemde verdunningsvloeistof vermengd tot de fluorescentie nog juist te zien is. Hij beoordeelt deze, door de buisjes te steken in gaten in de bovenwand van een zwarte doos, waarvan één zijde open is, om erin te kunnen kijken. Het licht valt boven in de buizen.

De waarde dezer methoden wordt daardoor sterk verminderd, dat in de urine pigmenten en andere stoffen de fluorescentie minder gevoelig kunnen maken.

Op de eigenschap van het U., een zwak zuur te zijn, trachtte Bogomolow een quantitatieve bepaling te bouwen. Aan een rij buisjes met telkens dezelfde portie urine, voegt hij stijgende hoeveelheden n/100 natronloog en daarna eenige druppels 1 promille $CuSO_4$ + wat chloroform toe. In het buisje waarin de reactie neutraal geworden is, wordt volgens B. de chloroform rood, terwijl bij het bereiken van het alkalische punt (het verschijnen van den absorptieband van het alkal. U.) de urine zelf bij het indruppelen van het $CuSO_4$ intensief rood wordt. Het aantal c.M.³ n/100 NaOH, dat men noodig heeft om van het neutrale tot het alkalische punt te komen, zou, vermenigvuldigd met 0.00063, de hoeveelheid U. aangeven.

Studenski maakte van de kleur der U.-koperverbinding op andere wijze gebruik. Hij voegde bij 20 c.M.^{3} urine in een scheitrechter 2 c.M.^{3} verzadigde $CuSO_4$ oplossing, verzadigde met ammoniumsulfaat en schudde dan met 10 c.M.^{3} chloroform uit. De U.-koperverbinding lost in den chloroform op. De bepaling geschiedde colorimetrisch door vergelijking met standaardoplossingen van het U.-koper in chloroform.

Met de genoemde methoden bepaalt men de som van U. en U.-geen in den vorm van urobiline. Dit zou tot goede uitkomsten kunnen leiden, indien het vaststond, dat het tenslotte bepaalde urobiline steeds dezelfde goed gedefinieerde chemische verbinding was. Maar dat dit op grond van de buitengewoon groote kwetsbaarheid van het U. molecule geenszins het geval kan zijn, hebben wij in het eerste hoofdstuk gezien. Zoodoende kan zich eenerzijds een groot deel van het U. aan de bepaling onttrekken, anderzijds deze laatste te hoog uitvallen, omdat als vergelijkingsstandaard bij de methode een U. preparaat gebruikt wordt, dat door secundaire veranderingen reeds veel van de sterkte der typische reacties van het natief U. verloren heeft en waarvan men dus, om eenzelfde intensiteit van de fluorescentie- of spectroscopische reactie te geven, een te groot aantal milligrammen moet gebruiken. Bij de gewichts-analytische methode van Hoppe-Seyler, brengt men bovendien zóóveel „ballast" mee ter weging, dat het de vraag is, of het gewicht hiervan dat van het U. zelf niet verre te boven gaat.

Het is de groote verdienste van Charnas geweest, ingezien te hebben, dat de bepaling van het totaal urobiline moest geleid worden over het urobilinogeen, aangezien het onmogelijk is, langs den directen weg het urobiline in zuiveren toestand te verzamelen. De moeilijkheid voor C. was, een manier te vinden, om het in de urine gepraeformeerd voorkomende of daarin later uit U.geen gevormde U. in U.geen over te voeren. Hij is daarin niet bevredigend geslaagd. Langs eenvoudigen chemischen weg was geen gemakkelijke en betrouwbare reductie te krijgen, ondanks vele pogingen. Hij kwam ertoe, zijn toevlucht te nemen tot een *biologische reductie*,

n.l. die, welke tot stand komt door de ammoniakale gisting der urine, kwam evenwel tot de ontdekking, dat zich hierbij uit het U. tevens een „urobilinogeen" vormt, dat op meer dan één punt van het natieve U.geen afwijkt; o.a. laat het zich ook bij alkalische reactie met aether uitschudden, geeft het bij de Ehrlich'sche aldehydreactie een meer blauwviolette tint en daarbij twee absorptiebanden inplaats van één. Voorts is het in tegenstelling met het echte U.geen gemakkelijk vluchtig en kan men er geen urobiline meer van maken. (C. is hier niet geheel duidelijk.)

Ondanks deze onaangename complicatie heeft C. toch de ammoniakale gisting voor de reductie gebruikt, welke dan ook later het aangrijpingspunt is geworden voor de kritiek op zijn methode door Wilbur en Addis, die vonden, dat door het bacterieele proces U. en U.-geen gedeeltelijk vernietigd worden.

De uitvoering der bepaling volgens Charnas is, in het kort weergegeven, als volgt: (naar Neubauer-Huppert, Analyse des Harns II blz. 1412):

Bij de urine voegt men ammoniumcarbonaat tot de reactie alkalisch is en laat haar dan 1 à 2 dagen in de broedstoof staan. Dan wordt zij in een groote schaal (heftig schuimen!) met een uitgekookte verzadigde oplossing van wijnsteenzuur sterk aangezuurd. Ontstaat hierbij een neerslag, dan filtreert men dit snel af. Nu schudt men de vloeistof met het 1½—2 voudig volumen gereinigden aether uit. Het aetherextract schudt men herhaaldelijk met kleine porties uitgekookt water uit. Is het sterk gekleurd (b.v. bij haematurie), dan voegt men een gelijk volumen petroleumaether toe en verwijdert de zich daarbij afscheidende storende kleurstof met weinig water. In het zoo verkregen extract kan men het urobilinogeen op twee manieren bepalen:

a. Als *urobilinogeen,* door de Ehrlich'sche aldehydreactie ermee uit te voeren en de concentratie spectrofotometrisch vast te stellen in het donkerste deel van den absorptieband, dien het spectrum van de paarse kleurstof vertoont (550-570). Daartoe brengt men 1 à 2 c.M.³ aetherextract + 0.2 à 0.5 c.M.³ eener koudverzadigde oplossing van dimethylparaami-

dobenzaldehyd in aether in een meetcylinder van 100 c.M.^{3} met ingeslepen glazen stop, voegt dan 2 à 3 druppels van met droog zoutzuurgas verzadigden absoluten alcohol toe en schudt 2 à 3 minuten krachtig door. Dan verdunt men met een passende hoeveelheid alcohol tot een bepaald volumen en brengt de roode vloeistof in de cuvet van den spectrofotometer. Is er slechts zeer weinig U.geen aanwezig (b.v. bij normale urines), dan neemt men 10 c.M.^{3} aetherextract + 0.2 à 0.3 c.M.^{3} aldehydoplossing + 2 à 4 druppels HCl-alcohol, schudt 2 minuten en voegt dan een passende hoeveelheid (minstens 2 c.M.^{3}) water toe, hetwelk de kleurstof opneemt.

b. Als *urobiline*. Hiertoe wordt het op bovenstaande wijze verkregen aetherextract belicht, tot al het U.geen urobiline geworden is, welke stof dan met water uit den aether geschud wordt. Met een stroom van lucht, of nog beter CO_2, drijft men den opgelosten aether uit het water, zout dan het U. met zuiver ammoniumsulfaat uit en filtreert af. Het neerslag lost men in natriumbicarbonaatoplossing op, zuurt met zoutzuur aan en zout wederom met ammoniumsulfaat uit. Het afgefiltreerde neerslag wordt met verzadigde amm. sulf. oplossing uitgewasschen en dan in het vacuum gedroogd. De droge stof neemt men in absoluten alcohol op, verdunt dezen passend met water en bepaalt in deze oplossing het U. spectrofometrisch.

Een andere werkwijze is deze, dat men het aetherextract in een scheitrechter gedurende een dag boven een laag water in de zon laat staan. Dan schudt men het U. in het water over. De waterige oplossing filtreert men, verzadigt haar dan met amm. sulf., filtreert het neerslag af, en extraheert dit luchtdroog met zoo weinig mogelijk absol. alcohol, welk extract men, na filtratie, in een gewogen schaaltje boven P_2O_5 in het vacuum droogt en dan weegt.

Voor de kliniek is de methode van C. weinig bruikbaar. Want een spectrofotometer is maar zelden beschikbaar, terwijl ook de met droog zoutzuurgas verzadigde absol. alcohol, die spoedig bederft, in de praktijk een te lastig reagens is.

De sub. b. beschreven „urobiline" modificatie is te omslachtig; de gewichtsanalytische variant ervan levert te weinig

materiaal op, om betrouwbare uitkomsten te kunnen leveren. Ook is m.i. de belichting van het eenmaal gevormde en zich in oplossing bevindende U. gevaarlijk, daar zij op den duur de stof in een kleurlooze verbinding omzet.

Brugsch en Retzlaff hebben gepoogd, de werkwijze van C. te verbeteren. Ook zij stuitten op de bovenvermelde afwijkende stof na de bacterieele reductie, meenden evenwel, dat zij niets met het U. te maken heeft, daar zij haar ook na de gisting van normale, U.geen-vrije, urines aangetroffen. Zij dachten met een indolachtig lichaam te doen te hebben, dat zij vóór de bepaling verwijderden, door de vloeistof, toen zij nog alkalisch was, met ligroïne uit te schudden. Eerst daarna zuurden zij met wijnsteenzuur aan en schudden het U.-geen volgens Charnas met aether uit. Inplaats van de spectrofotometrische bepaling der eindvloeistof kwam een colorimetrische, met een oplossing van bordeauxrood als vergelijkingsvloeistof.

Ook Flatow en Brünell hebben de methode van Charnas als grondslag voor een colorimetrische bepaling gebruikt. De reductie van het U. tot U.-geen laten zij achterwege. Zij zijn dus steeds op geheel versche urine aangewezen en verwaarloozen het daarin gepraeformeerd voorkomende U., omdat dit naar hun meening in geheel versche urine niet voorkomt, wat voor pathologische urine zeker onjuist is. Als vergelijkingsvloeistof nemen zij een soda-alkalische phenolphthaleïneoplossing.

Uitgaande van het beginsel van Charnas, dat een bepaling van de som van urobiline en urobilinogeen moet leiden over het U.-geen, zal een voor de kliniek bruikbare methode op de volgende punten verbetering moeten bezitten tegenover de bestaande:

1e. Moet de bacteriëele reductie van het U. tot U.-geen, als zijnde onbetrouwbaar, door een betere reductiemethode vervangen worden.

2. Moet de met het extract dezer reductievloeistof uitgevoerde Ehrlich'sche reactie, de condensatie van het U.-geen met

dimethylamidobenzaldehyde + zoutzuur, zóó te richten zijn, dat er geen U.-geen aan de reactie ontsnapt, dus b.v. door het sterke minerale zuur in urobiline overgaat. Immers reageert de laatste stof niet meer met het E. reagens. De gekleurde eindvloeistof mag dus slechts één absorptiestreep, n.l. 555—570, vertoonen.

3e Moet bij de beoordeeling der gekleurde eindvloeistof voor den kostbaren en moeilijk te hanteeren spectrofotometer de colorimeter in de plaats komen, waarbij het noodig is de beschikking te hebben over een vergelijkingsvloeistof van geheel constante samenstelling, die, zoo al niet blijvend te gebruiken, dan toch zonder veel moeite steeds weder versch te bereiden is.

Ik zal eerst het eerste punt, de *reductie van het urobiline* bespreken. De moeilijkheid hierbij was het U. geheel om te zetten in een stof, die zich in haar chemische en physische eigenschappen niet van het natieve U.-geen der urine laat onderscheiden. (Of zij er mee identiek is, kan zonder chemische analyse — voorloopig een vrome wensch! — niet uitgemaakt worden).

In het tweede hoofdstuk heb ik de pogingen tot reductie van het U. tot U.-geen reeds besproken.

Toen ik de rij van reductiemiddelen zelf probeerde, bleek mij, dat het vrij gemakkelijk is door reductie de bruine urobilinekleur te doen verdwijnen, maar dat daarbij nòg gemakkelijker het grootste deel van het U. in een vorm gebracht wordt, waaruit deze stof niet meer te regenereeren valt. Zoo stond het b.v. met die reductiemiddelen, waarbij in zure oplossing waterstof in *statu nascendi* het werk doet. Hierbij kwam nog een interessante bijzonderheid voor den dag: toen mij n.l. bleek, dat ook *metallisch magnesiumpoeder* + zuur (een ongewoon reductie-middel, Hopkins en Cole gebruikten het voor de reductie van oxaalzuur tot glyoxylzuur; zie S. W. Cole. Practical Physiological Chemistry, Cambridge, W. Heffer & Sons, 1919, blz. 39) een sterk ontkleurenden invloed heeft, probeerde ik het ook met dit poeder zonder méér. Vlug ging de reductie nu niet, maar zij bleek sterk versneld te worden door het poeder eerst eenigen

tijd in een 1-pro mille sublimaatoplossing te laten staan en dan deze suspensie aan de urine toe te voegen. Voert men dit uit in een hoog cylinderglas, giet men ter afsluiting van de lucht wat xylol op de vloeistof en zet men het glas even in water van ± 60° C., dan ziet men het Mg poeder door de eraangehechte waterstof-blaasjes in gesloten kolom opstijgen, waarna de ontkleurde vloeistof eronder spectroscopisch geen U. meer, maar blijkens de aldehydreactie wel U.-geen bevat, hetwelk — en dat is het bezwaar van deze wijze van reductie — uiterst gemakkelijk, b.v. door eenvoudig schudden met lucht, weder in urobiline overgaat, hetzij doordat andere in de urine aanwezige stoffen de luchtzuurstof snel op het U.-geen overdragen, of wel, omdat de ontstane leukoverbinding niet het U.-geen zelf, maar een ermede verwante stof is. Ik heb dan ook deze merkwaardige reductiemethode, die wellicht ook in de techniek hare diensten zal kunnen bewijzen, tijdelijk laten rusten en kom in het laatste hoofdstuk nog op haar terug.

Nadat een iets beter geslaagde proef met hydrochinon + natronloog de aandacht in de richting der alkalische reductie geleid had, bracht een korte opmerking in „Wolfrum's Chemisches Praktikum" over de voorzichtige reductie van nitrobenzaldehyd tot amidobenzaldehyd met ferrosulfaat + alkali de langgezochte oplossing, die nu zelfs, bij goed kiezen der omstandigheden, uiterst eenvoudig bleek te zijn. *Indien men n.l. eerst in de urine een overmaat van een ferrozout brengt* (ik gebruikte steeds het zout van Mohr, ferroammoniak-aluin) *en daarna druppelsgewijs, onder voortdurend ronddraaien der vloeistof, daarbij een zoodanige hoeveelheid natronloog laat vloeien, dat er veel NaOH overblijft, dan komt in de vuilgroen-troebele vloeistof de reductie tot urobilinogeen bij kamertemperatuur tot stand.*

Na twee uur staan in het donker onder afsluiting der lucht, is in de bovenstaande heldere vloeistof geen of slechts uiterst weinig U. meer aantoonbaar: het spectrum is „schoon" en de reactie van Schlesinger is in de voorzichtig tot het phenolphtaleïnepunt geneutraliseerde vloeistof negatief, maar wordt dadelijk positief door tinct. jodii. Lang staan, zelfs gedurende

weken, van de troebele vloeistof, laat het U.geen onveranderd, als men maar zorgvuldig lucht en licht verre houdt. Het groene neerslag adsorbeert geen U. geen, zoodat men kan filtreeren en de bepaling met een aliquot deel van het groengele filtraat kan uitvoeren.

Indien men nu vraagt, of de opbrengst aan U.-geen bij dit reductieproces quantitatief is, dan moet ik hierop antwoorden, dat ik nog geen manier gevonden heb, om dit te weten te komen. De verklaring hiervoor is weder de buitengewone gevoeligheid van het U. voor allerlei chemische en physische invloeden, die het onmogelijk maakt, deze stof te bereiden in een samenstelling, welke van die van het in de urine gepraeformeerd voorkomende U. niet afwijkt. *Nog nooit heeft naar mijne meening iemand zuiver, onveranderd, urobiline in handen gehad.* En het is juist de reduceerbaarheid tot U.-geen met ferro-zouten en alkali, die naar ik geloof, een zeer gevoelige indicator is voor veranderingen in het urobilinemolecule. Een intensief en lang belichte urine waarin alle U.-geen in U. is omgezet en waarvan het spectrum dus een zware U. streep laat zien, kan wèl door de reductie met ferro-zout + alkali het grootste deel van dit U. weer kwijtraken, maar het reductieproduct is niet meer het met aether extraheerbare en dan met Ehrlich's reagens paars wordende urobilinogeen. Hoe minder licht men voor de omzetting van het U.-geen in U. gebruikt, des te beter gelukt de reductie van het oxydatieproduct. Indien het gelukken zou de omzetting in U. geheel zonder de hulp van licht en chemicaliën, alleen door de zuurstof der lucht, te bewerken, dan zou daarmede waarschijnlijk de vraag op te lossen zijn. Dan immers moet, wil de reductie quantitatief verloopen, dezelfde U.geen rijke urine, vóór en ná de luchtoxydatie aan het reductieproces onderworpen, dezelfde U. geen waarde opleveren. Evenwel gaat de oxydatie zonder licht uiterst langzaam, men krijgt (bacterieele?) omzettingen, die het urobiline na eenigen tijd geheel uit de vloeistof doen verdwijnen. Ik heb deze proeven nog niet kunnen afsluiten.

Groote moeite verschafte het boven sub. 2e genoemde punt, het onderzoek naar de *voorwaarden, die voor het ver-*

krijgen van een maximale opbrengst aan kleurstof bij de E. reactie vervuld moeten worden.

Charnas had hier den weg gewezen. Hij merkte op, dat de van Ehrlich afkomstige en in de kliniek nog steeds gebruikte wijze van uitvoering der reactie (toevoegen van enkele druppels van het gemengde reagens aan de versche urine) zeer gebrekkig is. Een groot deel van het U.-geen reageert daarbij niet, maar gaat onder invloed van het sterke zuur in urobiline over. Grossmann zag, dat in sommige urines, die wèl U.-geen bevatten, de reactie tòch negatief was, maar positief werd, indien deze gedialyseerd werden, waaruit hij de aanwezigheid van storende stoffen vermoedde. Steensma toonde aan, dat dit inderdaad het geval is: een urine, die de storing sterk vertoonde, was, aan een andere, goed reageerende, urine toegevoegd, in staat ook in deze de reactie te doen mislukken. Hij vond deze storende stof ook wel eens in normale urine.

Zooals wij gezien hebben, wijzigde Charnas de Ehrlich' sche reactie zóó, dat hij haar uitvoerde met de oplossing van het U.-geen in aether, verkregen door de met wijnsteenzuur aangezuurde urine met aether uit te schudden. Aan dit aetherextract voegde hij dan de twee componenten van het E. reagens gescheiden toe en wel éérst het in aether opgeloste aldehyd, dat daardoor gelegenheid kreeg zich alvast met het U.-geen te binden, en dán het zoutzuur. Dit laatste gebruikte hij in den vorm van droog HCl-gas, opgelost in absol. alcohol, teneinde de vernietigende werking van het zoutzuur op het U.-geen zooveel mogelijk te beperken. Nadat dan 3 minuten geschud was, werd met alcohol verdund en van de aldus verkregen gekleurde vloeistof de absorptieverhouding in de streek 550—570 spectrofotometrisch bepaald. Bij geringe U.-geen-concentraties in de urine voegde C. na het schudden geen alcohol, maar water in geringe hoeveelheid toe, hetwelk de kleurstof opneemt.

De wijze van uitvoering met HCl.-gas, opgelost in absol. alcohol, kon mij niet bevredigen. Want 1° is de bereiding van dit reagens, die alle 14 dagen opnieuw geschieden moet, een bezwaar in een kliniek, 2e wordt het doel, uitsluiten van de

werking der *waterige* HCl.-oplossing op het urobilinogeen er toch niet mee bereikt, daar het zoutzuurgas zich meester maakt van in den aether opgelost water en dan, met kleurstof beladen, zich toch tijdelijk afscheidt; 3e. is de opbrengst aan kleurstof volgens mijne ervaring kleiner dan met de straks te bespreken wijziging en 4e. heeft ook het aldehyd een eigen kleur, die in de reactievloeistof blijft en bij de colorimetrische bepaling een storende bijtint geven kan.

Men kan het zoutzuur niet vervangen door een zwakker, organisch zuur, of b.v. door azijnzuur-anhydride. Broomwaterstofzuur vond ik bruikbaar, maar niet beter dan zoutzuur.

Het bleek evenwel mogelijk het lastige HCl-alcohol-reagens te vervangen door sterk zoutzuur alléén (38%, Sg. 1.19) en de kleurstof met water uit te schudden, — beide door C. ook reeds gedaan —, zonder, zooals hij, last te hebben van omzetting van het U.-geen in U., dus van het optreden van twee absorptiestrepen in plaats van één. Daartoe moet men het reactieproduct slechts kort,niet langer dan hoogstens 2 minuten met het HCl in aanraking laten, dus niet langer dan dien tijd schudden, *en dan snel door middel van een verzadigde natriumacetaatoplossing het zoutzuur door azijnzuur, dat niet meer schadelijk is, vervangen, waarbij tegelijk het aldehyd weer in den aether overgaat.*
Na opnemen van de kleurstof in water en aftappen hiervan, kan de aether opnieuw met zoutzuur geschud worden, om laatste resten van U.-geen alsnog aan de reactie te doen deelnemen. Ook dan weer natriumacetaat en water om de kleurstof op te nemen.

Is bij een geringe U.geen-concentratie het eindvolumen der gekleurde vloeistof klein en wordt daardoor de bijtint van het mede in het water opgeloste aldehyd storend, dan moet die vloeistof door uitschudden met verschen aether van dit aldehyd bevrijd worden.

De handelsaether bevat vaak oxydeerende stoffen en moet daarom steeds gereinigd worden door éénmaal uitschudden met sterken (30%) natronloog, gevolgd door driemaal wasschen met water, waarna men hem in een bruine flesch bewaart.

Het gelukte op deze wijze bij de meeste urines een gekleurde eindvloeistof met slechts één absorptieband 555—570 te verkrijgen. Voorwaarde hiervoor is, dat de reductie inderdaad volledig is. Was zij dit niet, dan gaat er U. in den aether en later in de eindvloeistof over.

Toch kwam het bij goede reductie voor, dat een geheel kleurloos aetherextract slecht of zelfs in het geheel niet volgens Ehrlich wilde reageeren en er in plaats van de mooi paarse eindkleur een roodachtige tint ontstond, blijkens den spectroscoop aan U. toe te schrijven. De storende oxydeerende stof, die daar blijkbaar in de urine aanwezig was (Grossmann, Steensma) en mede in den aether overging, was uit den laatsten bijna altijd te verwijderen door dezen viermaal met kleine porties water uit te schudden.

Er bleven echter enkele urines over, waar ook dit redmiddel, het reinigen van het aetherextract met water, faalde en die mij tenslotte, daar ik geen anderen uitweg kon vinden, deden uitzien naar een ander extractiemiddel, waarin de storende stof onoplosbaar zou zijn. De leerzame dissertatie van K. Thomas, reeds herhaaldelijk geciteerd, deed de aandacht vallen op den petrol. aether, die wèl het U.-geen, maar niet het U. zelf oplost. Weliswaar is de p.a. een niet zoo goed extractiemiddel voor U.-geen als de aether, maar men kan toch, door de met wijnsteenzuur flink aangezuurde waterige vloeistof met de 4-voudige hoeveelheid p.a. uit te schudden, met een éénmalige extractie nagenoeg alle U.-geen uit het water halen. Bij aether is hiertoe de tweevoudige hoeveelheid voldoende.

Het bleek nu al spoedig, dat de p.a. de storende oxydeerende stof niet mee-extraheert en verder ook, dat hij in het algemeen in urine een meer electief extractiemiddel van het urobilinogeen is dan gewone aether. Want, hoe donker van kleur ook de urine is, het p.a. extract der gereduceerde vloeistof is steeds kleurloos. Bij het gebruik van aether is dit lang niet altijd het geval, zoodat men dan ook, volgens Charnas werkende, in het aetherextract vaak de storende nevenkleurstoffen met petr. aether moet neerslaan.

Het nadeel van den p.a. is, dat het volume van het extract

dubbel zoo groot is en zelfs nòg eens verdubbeld moet worden vóór de aldehydtoevoeging, en wel door bijvoegen van een gelijk volumen aether, daar zonder dezen kunstgreep het gekleurde condensatieproduct tijdens het schudden tesamen met het aldehyd neerslaat, met belangrijk verlies in de uitkomst. Een bezwaar is ook, dat men met het afgewerkte mengsel van aether en p.a. niets meer beginnen kan, terwijl de onvermengde aetherresten verzameld en gereinigd en hieruit de aether door destillatie teruggewonnen kan worden.

Hoewel de p.a. in enkele gevallen onmisbaar is, zal men in de practijk bijna altijd aether kunnen gebruiken.

Na de bespreking van de reductie van het U. en van de techniek der E. reactie, blijft nog het laatste der 3 bovengenoemde punten over: *de bereiding van een goede vergelijkingsvloeistof voor den colorimeter.*

Ik had deze, na veel probeeren, eindelijk gevonden in een 1/1000 normaal oplossing van jodium in chloroform, bereid door de even sterke waterige oplossing van joodjoodkalium met een gelijk volumen chloroform uit te schudden. Omdat deze 1/1000 normaal oplossing van jodium in chloroform evenwel een te roode tint had, moest zij bijgekleurd worden met indigotine. Met dezen standaard heb ik zeer lang bevredigend gewerkt, hoewel algeheele gelijkheid van kleur in den colorimeter somtijds niet verkregen kon worden.

Aanvankelijk had ik getracht, mij van den phenolphtaleïnestandaard van Flatow en Brünell te bedienen, maar deze beviel mij in dien tijd niet, omdat ik toen alle voorwaarden voor reductie en quantitatieve reactie van het U.-geen nog niet zóó beheerschte, dat de eindvloeistof vrij van urobiline was. Hierdoor ontstond dan een geelroode bijkleur, die de vergelijking van wig en cuvet bezwaarlijk maakte.Eerst na het geheel uitwerken der methode met behulp van den jodium-indigotine-standaard bleek, dat bij een optimale, zuiver paarsroode eindvloeistof de phenolphtaleïne-standaard een juistere vergelijkingskleur geeft dan de jodium-indigotine-chloroformoplossing, zoodat ik toen de laatste vaarwel gezegd heb. De phenolphtaleïnestandaard wordt als volgt bereid: Voeg in een maatkolf van 100 c.M.^{3} bij ± 50 c.M.^{3} gedestilleerd water

met een maatglaasje 10 c.M.³ eener 10% oplossing van watervrij natriumcarbonaat (geen natronloog!), dan met een *nauwkeurige* pipet (geijkt door het Staatsprüfamt für Glasgeräte, Ilmenau) 1 c.M.³ eener *0.05 pCt. alcoholische oplossing van phenolphthaleine* en vul met gedest. water aan tot de streep. De paarse vloeistof wordt elken dag versch bereid.

IJken van den colorimeter vóór het in gebruik nemen is noodzakelijk. Men doet dit zóó, dat men in cuvet en wig de oplossing eener zelfde kleurstof (ik neem altijd 1/4 normaal kaliumbichromaat) brengt, de concentratie in de wig onveranderd laat en die in de cuvet regelmatig, b.v. telkens met 10%, vermindert. De afgelezen punten brengt men op millimeterpapier in curve, waarbij de colorimetergraden (0—100) de ordinaten en de kleurstofconcentraties (100-90-80 enz. % van de conc. in de wig) de abscissen vormen. De gevonden punten zullen op een rechte lijn liggen, die van de theoretische meer of minder afwijkt. Bij het practisch gebruik dezer curve trekt men na het aflezen van den colorimeter van het met de aflezing overeenkomende punt der ordinaatlijn een horizontale lijn naar de gevonden curve, zoekt het verticaal onder dit snijpunt liggende punt der abscis op en leest hier de concentratie in procenten van die in de wig af.

Na deze uiteenzettingen zal de *beschrijving der bepaling* zelve weinig toelichting meer behoeven.

Het verzamelen der urine. Aangezien de belichting invloed heeft op de reduceerbaarheid van het U., moet het oorspronkelijk aanwezige U.-geen zooveel mogelijk onveranderd blijven. De urine wordt dus dadelijk na de loozing in een zwarte of zeer donkerbruine flesch gebracht en daarin gedurende 24 uur verzameld. Ik liet de flesch bovendien nog in het kastje naast het ziekbed bewaren. Een goed conserveerend middel is het *salicylzuur,* dat men in den vorm van een verzadigde alcoholische oplossing vooraf in de leege flesch doet en wel 10 c.M.³ voor de daghoeveelheid urine.

Het reductieproces. Na het meten van de totale hoeveelheid urine brengt men 80 c.M.³ in een wijd bekerglas, voegt erbij 20 c.M.³ eener versch bereide 16% oplossing van zuiver Mohr's zout (ferro-ammoniak-aluin) en mengt. Daarna

druppelt men uit een pipet, onder voortdurend ronddraaien der vloeistof in het bekerglas, 20 c.M.³ eener 12% oplossing van NaOH*) toe en giet dan de groen-troebele vloeistof onmiddellijk over in een meetcylinder of fleschje, dat men zóó vol giet, dat de stop zonder luchtbel erop geplaatst kan worden, waarna men het geheel tot den volgenden dag in het donker wegzet. Na afloop van dezen tijd is het neerslag voldoende bezonken om in de bovenstaande heldere vloeistof te kunnen vaststellen, of de reductie bevredigend verloopen is, d.w.z., of de band van het alkalische U. ontbreekt.

In zeer urobilinerijke urines kan het voorkomen ,dat de genoemde hoeveelheden ferrozout en natronloog niet voldoende zijn voor een complete reductie. Men neme dan de verhouding 80 urine + 40 ferro-oplossing + 40 natronloog.

De filtratie. Men filtreert door een droog, zuiver filter (b.v. No. 589 S. en S., 12.5 Cm.) in een bruin fleschje en werke de bepaling nu verder zonder onderbreking af, daar door licht en zuurstof het U.-geen langzaam weder in U. overgaat.

De extractie. Extraheert men met *aether*, dan pipetteert men 20 c.M.³ van het reductiefiltraat in een scheitrechter, maakt met 4 à 5 c.M.³ eener 20 pCt. wijnsteenzuuroplossing flink zuur (controleeren!) en schudt met 40 c.M.³ gereinigden (zie boven blz. 36) aether uit. Men schudt ± 60 maal flink op en neer en laat na 20 maal schudden den overdruk uit de kraan uit. Na de scheiding der lagen, die snel tot stand komt, tapt men de onderlaag af. Hierin bevindt zich dan geen noemenswaardige hoeveelheid U.-geen meer. Den aether giet men zonder bijmenging van waterdruppeltjes uit den mond van den scheitrechter af in een maatglaasje, waaruit men 30 c.M.³ ervan in een schoonen, drogen scheitrechter brengt. Dezen aether schudt men dan 4 maal uit met telkens een paar c.M.³ aq. dest., dat men telkens door de kraan laat afvloeien.

De condensatie. Nu voegt men toe 3 c.M.³ eener verzadigde oplossing van paradimethylamidobenzaldehyd (Merck) in

*) Men keere de volgorde: ferrozout-natronloog niet om.

gereinigden aether, mengt even en druppelt daarna snel 10 druppels 38% HCl (Sg. 1.19) bij, waarna men *onmiddellijk* begint met krachtig te schudden, wat men gedurende 1½ minuut voortzet. Dan spuit men snel eenige c.M.³ aq. dest. bij, schudt eenige malen krachtig door en voegt dan 3 c.M.³ eener verzadigde natriumacetaatoplossing toe, *die men tevoren klaar gezet heeft.* Wederom even doorschudden en dan de onderstaande paarse vloeistof in een maatglas aftappen, den aether met een paar c.M.³ aq. dest. nawasschen en dit water bij de hoofdportie voegen. Was er veel U.-geen, dan bevindt zich in den aether nu nog een geringe hoeveelheid dier stof, die nog niet gereageerd heeft en moet men den aether opnieuw, weder gedurende 1½ minuut, nu met 5 druppels HCl, schudden, weder water en 1½ c.M.³ natriumacetaat toevoegen en de zwak gekleurde onderlaag met de hoofdportie vereenigen.

De eindvloeistof. De tenslotte verkregen gekleurde eindvloeistof moet passend verdund worden. Zoolang men den graad dezer verdunning niet direct op de kleur schatten kan, vergelijke men de kleur in het maatglas met die van den phenolphthaleinestandaard in een maatglas derzelfde grootte.

De vloeistof mag niet meer dan een uiterst zwakken absorptieband op de urobilineplaats vertoonen. Is die band er duidelijk, dan is òf de reductie niet volledig geweest òf er heeft tijdens het schudden met HCl reoxydatie plaats gehad. Heeft men geen kunstfouten gemaakt, die dit laatste verklaren kunnen (te korte reductietijd, ongereinigde aether, ongewasschen aetherextract), dan is het noodig de bepaling te herhalen men petr. aether in plaats van aether.

Is de hoeveelheid U.-geen in de urine zeer klein, b.v. bij de bepaling in normale urine, dan moet men erop bedacht zijn, het volume der eindvloeistof klein te houden, b.v. 5 c.M.³ Daar toe is het noodig, slechts 5 druppels HCl te gebruiken, na het schudden ongeveer 1 c.M.³ water toe te voegen, weer te schudden, dan 1½ c.M.³ natriumacetaat en opnieuw schudden, waarna men de vloeistof aftapt en den aether nog met 1 à 2 c.M.³ water nawascht. Heeft men in het maatglaasje tot 5 c.M.³ aangevuld, dan verdient het aanbeveling, de geheele eindvloeistof nog een keer met verschen aether

uit te schudden, om het aldehyd, dat speciaal in deze sterk zure oplossing in grootere hoeveelheid aanwezig blijft en dan door zijn gele kleur storend werkt, te verwijderen.

De colorimetrische bepaling. De aldus verdunde eindvloeistof late men niet staan, maar brenge haar zonder verwijl in de cuvet van den colorimeter van Autenrieth, terwijl de phenolphthaleinestandaard (zie blz. 39-40) zich in de wig bevindt. Men maakt de kleuren gelijk, leest af en ziet op de ijkingscurve, hoe groot de concentratie in de cuvet, uitgedrukt in procenten van die in de wig, bedraagt.

De berekening van het eindresultaat. Ik drukte de concentratie van het U. steeds in *„eenheden"* uit met de bedoeling later vast te stellen, met hoeveel U. één eenheid overeenkomt.

Ik noemde dan de concentratie in de gekleurde einvloeistof één eenheid, wanneer de kleur ervan dezelfde was, als die van den bovenbeschreven soda-alkalischen 0.0005 % phenolphthaleinestandaard. Na het gelijkmaken der kleuren met den colorimeter kon dus op de ijkingscurve van het instrument de concentratie der eindvloeistof in hondersten van één eenheid (de concentratie in de wig) afgelezen worden. Om nu hieruit de concentratie van het uitgangsmateriaal, de urine, te berekenen, moeten de verschillende verdunningen, die deze in den loop der bewerking doorgemaakt heeft, in aanmerking genomen worden .Was het volume der eindvloeistof b.v. 25 c.M., dan zijn deze verdunningen bij het volgen der „normaal-methode" met gewone hoeveelheden reductiemiddel en met aether als extractiemiddel, als volgt:

van urine op reductiefiltraat 1.5 ×.
„ reductiefiltraat op aetherextract 2 ×.
„ aetherextract op eindvloeistof $^{30}/_{25}$ of 1.2 ×.

In het geheel dus $1.5 \times 2 \times 1.2 = 3.6 \times$.

Was de kleurintensiteit in de cuvet nu b.v. 76% van die in de wig, dan bedroeg de U. concentratie in de urine $3.6 \times 0.76 = 2.7$ eenheden.

Nu zijn evenwel de hoeveelheden der reagentia bij de bewerking zóó gekozen, dat in de eindvloeistof juist het U.geen van 10 c cm. urine terechtkomt, wat de berekening ver-

gemakkelijkt. Want is het volume der eindvloeistof nu 10 c cm. dan is de concentratie erin ook dezelfde als in de urine zelve; is het grooter of kleiner, dan is de berekening voor de concentratie in de urine uiterst eenvoudig.

Gebruikt men andere verhoudingen bij reductie of extractie, dan geve men zich bij de berekening rekenschap van de toegepaste verdunningen.

Is men gedwongen, voor de extractie van het reductiefiltraat *petrol. aether* (Sg. 0.65: kookpunt 40—60° C.) te gebruiken, dan neemt men op 20 c.M.³ aangezuurd reductiefiltraat 80 c.M.³ petr. aether ,schudt ongeveer 80 maal flink op en neer en brengt 60 c.M.³ extract in een schoonen scheitrechter. Het uitwasschen met water is nu overbodig. Wèl is het noodig nog 60 c.M.³ gereinigden aether toe te voegen. Men neemt 5 c.M.³ aldehydoplossing en 10 druppels HCl. Verder als bij de aetherextractie, behalve, dat opnieuw schudden van het extract, weder met 10 druppels HCl, nu in geen geval achterwege mag blijven.

Veel nut had ik van den petroleum-aether ook in die gevallen, waar het *U. naast veel bilirubine in de urine* aanwezig was. Gebruikt men dan aether, dan krijgt deze een gelige bijtint, die later in de eindvloeistof overgaat. Petroleumaether neemt zelfs geen spoor galkleurstof op.

Men kan de petr. aether-extractie gebruiken als hulpmiddel *om aan de qualitatieve reactie van Ehrlich-Neubauer op urobilinogeen in de urine een meer betrouwbaren vorm dan den gebruikelijken te geven,* door het U.-geen ter uitsluiting der stoffen, die reactie storen, tevoren te isoleeren. Men zuurt daartoe in een flinke reageerbuis ± 5 c.M.³ versche urine met 5 druppels 20% wijnsteenzuur aan en schudt met ongeveer het 4-voudig volumen petrol. aether uit (±80 maal schudden). Na het bezinken der onderste laag brengt men van den petr. aether zooveel in een andere reageerbuis, als zich gemakkelijk laat afschenken. Daarbij giet men een gelijk volumen gereinigden aether, dan een scheutje eener verzadigde aldehydoplossing in gereinigden aether en dan 5 druppels 38% HCl, schudt gedurende een minuut krachtig door, spuit dan een scheutje gedest. water bij, schudt door, voegt dan ± 2 c.M.³

eener verzadigde natriumacetaatoplossig toe en schudt weder krachtig. Een paarsroode verkleuring der onderste laag met een absorptieband 555—570 wijst op urobilinogeen. In het schatten der intensiteit van de reactie is deze vorm van de aldehydproef aangenamer dan de reactie van Schlesinger, die in haar beoordeeling zoozeer van aard en sterkte der belichting afhankelijk is. Zij kost bovendien, wanneer de reagentia gereed staan, nog iets minder tijd dan deze en staat in gevoeligheid ongeveer met haar gelijk.

Men kan ook zóó te werk gaan, dat men het kleurlooze petroleumaetherextract (80 c.M.^{3}) van 20 c.M.^{3} urine uitschudt met 20 c.M.^{3} gedest. water, waaraan men 4 druppels 10 pCt. natronloog heeft toegevoegd. Het U.geen gaat in dit zwak alkalische water over. Het kan hierin aangetoond worden, òf direct, met de reacties van Ehrlich, aldehydreactie of eidooierreactie, òf indirect, na omzetting in urobiline.

a. Voor de uitvoering der *aldehydreactie van Ehrlich-Neubauer* voegt men bij 5 c.M.^{3} der vloeistof 10 druppels van het Ehrlich'sche aldehydreagens (paradimethylamidobenzaldehyde 0,4 gr., HCl 38 pCt. 10 c.M.^{3}, aq. dest. 10 c.M.^{3}) waarbij een paarsroode verkleuring optreedt met een absorptieband op 555—570, naast den zuren urobilineband;

b. *Ter uitvoering der eidooierreactie van Ehrlich-Thomas* bereidt men het hiervoor noodige reagens door de twee gebruikelijke reagentia voor de diazoreactie te mengen in de verhouding 6 c.M.^{3} Ehrlich A + 2 druppels Ehrlich B, en het mengsel bij een gelijk volumen der waterige U.-geen-oplossing te voegen, waarbij een oranjebruine verkleuring optreedt.

c. Voor de omzetting in urobiline zuurt men 5 c.M.^{3} der vloeistof met 4 druppels 6 pCt. azijnzuur aan (reactie controleeren) voegt dan een gelijk volumen van Schlesinger's reagens toe en filtreert af. De overgang van geheel kleurlooze vloeistof tot prachtige groene fluorescentie door toevoegen van 1 druppel joodtinctuur aan een deel van het filtraat is zeer opvallend.

Voor een college-proef, ter demonstratie der hoofdeigenschappen van U.-geen en urobiline, zijn deze eenvoudige proefjes zeer geschikt.

Het groote voordeel, dat men van de petrol. aether-ex-

tractie heeft voor de bereiding van zuiver urobiline zal in het laatste hoofdstuk ter sprake komen.

Wie belang stelt in de *onderlinge verhouding van U. en U.-geen in een bepaalde urine*, moet het U.-geen in de niet-gereduceerde urine bepalen, door deze flink met wijnsteenzuur aan te zuren (1 druppel per c.M.^{3}) en verder extractie en bepaling op de gewone wijze te doen. Het verschil van het totaal U. en het zóó bepaalde U.-geen geeft het U. zelf.

Ter afsluiting van dit hoofdstuk behoort hier te volgen een *critiek op de beschreven methoden*, zoowel de oudere als de eigen. Het schijnt a priori onmogelijk een werkwijze voor de quantitatieve bepaling eener stof op hare juistheid te beoordeelen, indien deze stof nog nooit zuiver is afgezonderd en dus het elementaire standaardobject ontbreekt. En dit is voor het urobiline het geval. De buitengewone gevoeligheid ervan voor allerlei ingrepen hebben wij in het eerste hoofdstuk besproken, alsmede het feit, dat de kristallisatie nog niet gelukt is. De standaardpraeparaten, die ter toetsing der bestaande U. methoden gebruikt zijn, lijden dan ook ongetwijfeld alle aan meer of minder sterke onzuiverheid. Het gevolg hiervan is, dat in een gegeven geval het bepaalde U. met een te hoog getal wordt aangegeven. Van welke typische eigenschap der stof men ter quantitatieve bepaling ervan gebruik gemaakt heeft, hetzij van de fluorescentieproef, of van den absorptieband van het U. zelf of zijn zinkverbinding, doet daarbij niet ter zake: steeds zal de omstandigheid, dat het standaardpraeparaat die typische eigenschap niet op de volle sterkte vertoont, bewerken, dat de eigenlijke bepaling te hoog uitvalt, indien bij deze laatste de verslechterende invloeden op die eigenschap ontbroken of in mindere mate gewerkt hebben. Dit geldt b.v. voor de verdunningsmethoden, die op de fluorescentie der zinkverbinding gegrond zijn (Viglezio, Grimm, Schlesinger, Peters, Adler). Maar ook het omgekeerde is denkbaar, dat n.l. de deletaire invloeden op het U., door de bepaling zelve uitgeoefend, grooter zijn dan die, welke op het standaardpraeparaat gewerkt hebben. Dan zal de bepaling te laag uitvallen. Meestal zullen beide facto-

ren tegelijk in werking zijn. Zoo ontmoet men bij de methode Saillet en de van haar afgeleide werkwijzen eenerzijds den verlagenden invloed van de gevaarlijke bewerking (salpeterzuur, zoutzuur, alcohol, chloroform, jodium), anderzijds den verhoogenden van het onzuivere standaardpraeparaat (hydrobilirubine van Maly, urobiline uit den handel).

De bovenstaande bezwaren zijn geen schrijftafelconstructies. De labiliteit van het U. molecule is een harde werkelijkheid, waarvan ieder, die met die stof op een ietwat meer diepgaande wijze experimenteert, de lasten heeft ondervonden. De reusachtige verschillen in de opgaven over het U. gehalte der normale urine, die wisselen van 130 mgr. bij Saillet tot „Spuren" bij Brugsch en Retzlaff, vinden daarin hun dieperen grond.

De oude methode van Hoppe-Seyler, die ons aantrekt, omdat zij een gravimetrische is, geeft door het mede-extraheeren en ter weging brengen van andere stoffen, zeker veel te hooge waarden.

De methoden, die de verdunningsgrens der fluorescentieproef opzoeken, zijn te veel van het subjectief oordeel van den waarnemer afhankelijk en houden bovendien geen rekening met den invloed, dien de zouten en de andere kleurstoffen der urine op de fluorescentie kunnen uitoefenen.

De urobilinogeenmethode van Charnas en hare dochtermethode, die van Brugsch en Retzlaff, strandt op de onbetrouwbare biologische reductie, waarbij door de ammoniakale gisting der urine een deel van het U.-geen verloren gaat, terwijl er een vreemde, eveneens de aldehydreactie gevende stof, naast het U.-geen ontstaat. De methode van Flatow en Brünell houdt geen rekening met het gepraeformeerd voorkomend U. en bepaalt alleen het U.-geen.

Wij kunnen dus de stelling formuleeren, dat er geen goede methode voor de quantitatieve bepaling van het U. in de urine bestaat, en wel 1e. omdat er geen zuiver urobiline ter ijking van zoo'n bepaling beschikbaar is, 2e. omdat bovendien veelal door de bewerking van de urine de stof gedeeltelijk ontleed wordt.

Dat hierdoor het oordeel over de eigen methode buiten-

gewoon bemoeilijkt werd, ligt voor de hand. Er bestond dus geen standaardmethode om de nieuwe werkwijze aan te toetsen. Wilde ik met behulp van haar het U. gehalte in milligrammen uitdrukken, dan was het ter ijking van haar volstrekt noodzakelijk de beschikking te hebben over zuiver urobiline of urobilinogeen resp. hemibilirubine. Nadat het eenigen tijd experimenteeren met de laatste stof mij van de groote gevoeligheid ervan voor oxydatie overtuigd had, dus van de onmogelijkheid om tot een stabiel praeparaat te geraken en ik dus op het urobiline zelf aangewezen was, luidde de opgave dus: *Gegeven de groote gevoeligheid van het U. molecule, die het verblijf in eigenlijk alle oplosmiddelen gevaarlijk maakt, deze stof te bereiden, zonder dat zij ooit opgelost geweest is en dan onmiddellijk in geheel zuiveren toestand.* Deze puzzle, die mij veel hoofdbrekens heeft gekost, heb ik trachten op te lossen door het U. te laten ontstaan uit het U.-geen in het petroleumaetherextract van het reductiefiltraat van urine of faeces, die rijk waren aan die laatste stof.

Het U. is n.l. in petr. aether absoluut onoplosbaar, zoodat het zich bij belichting aan de lucht der U.-geen oplossing daaruit als een uiterst fijn poeder afscheidt, zonder dat er een aanvankelijk stadium van opgelost zijn aantoonbaar is. In het laatste hoofdstuk zal ik dit U. bespreken; hier alleen dit erover ,dat het zich van de beschreven urobilinen onderscheidt door de zeer veel grooter verdunningen, die het verdraagt, vóór fluorescentieproef en spectroscopische reactie negatief worden.

In het op deze wijze afgescheiden U. had ik een middel om te weten te komen, *hoe groot eigenlijk de U. concentratie was, die ik tot dusverre met „één eenheid" betiteld had.* Daartoe moest een petrol. aetherextract eenerzijds met de aldehydreactie op zijn aantal eenheden onderzocht worden, anderzijds daarin door belichting aan de lucht het U.-geen in urobiline veranderd en dit ter weging gebracht worden. Van een dergelijke bepaling geef ik hier een voorbeeld:

Het op de normale wijze verkregen reductiefiltraat eener urine, die veel U.-geen bevatte, werd met wijnsteenzuur aangezuurd, toen 2 maal uitgeschud met het dubbele volumen

petroleum-aether. Het extract werd 3 x met water gewasschen en toen in het donker gedroogd met $CaCl_2$, daarvan afgefiltreerd en op zijn U.-geen-concentratie onderzocht op de wijze, als dit op blz. 43 voor de petrol. aether methode is aangegeven. Deze concentratie was 4 eenheden. 3.65 Liter van dit extract werden in het donker afgedestilleerd, totdat er ongeveer 0.5 Liter over was, waarna de destillatiekolf met inhoud in het diffuse daglicht (geen zon) gebracht en daaraan gedurende 3 weken blootgesteld werd. Dagelijks werd door krachtig schudden lucht in de vloeistof gebracht. Een langzaam bezinkend oranjerood poeder scheidde zich af en de heldere bovenstaande petr. aether bevatte ten slotte geen U.-geen meer (aldehydreactie). Nu werd gefiltreerd op een Gooch-filter en alles goed met petr. aether uitgewasschen. Het U. tegen de wand van den dest. kolf werd in weinig kouden alcohol 97 pCt. opgelost, waarna deze zelfde alcohol gebruikt werd om de hoofdmassa op den Gooch op te lossen. Het filtraat werd in een luchtstroom bij kamertemperatuur verdampt; de rest bleek 0.0593 gram te wegen.

3650 c.M.^{3} met een concentratie van 4 eenheden bevatten dus 0.0593 gram, d.w.z *dat een concentratie van één eenheid beteekent 0.000406 gram urobiline per 100 c.M.*^{3}

Het lag voor de hand het nieuwe U.-praeparaat (d.w.z. zóó als dit uit den petr. aether is afgescheiden en afgefiltreerd, *niet*, nadat het in alcohol opgelost geweest is) op zijn reduceerbaarheid met ferrohydroxyde te onderzoeken. Deze bleek in sterke mate aanwezig te zijn, maar toch was zij in zooverre een teleurstelling, dat het U.-geen, dat ontstond, slechts $\pm$ 50% van de berekende hoeveelheid bedroeg (berekend op de basis 1 E. = 0.4 mgr. U.). Ik geef dit getal evenwel onder voorbehoud, daar deze proeven nog niet afgeloopen zijn en ik nog niet weet, of het deficit toe te schrijven is tóch aan een gedeeltelijke verandering van het U.- onder den invloed der belichting of aan het tekortschieten der reductie zelve, hetzij deze een deel van het U. ongereduceerd laat, of wel in andere stoffen verandert, die geen aldehydreactie geven. Ondanks dit resultaat acht ik het dus nog niet uitgesloten, dat de reductie van het *natieve* urobiline

quantitatief tot U.-geen verloopt. Mocht zij dit niet doen, dan is dit natuurlijk een fout der methode en moet deze fout zoo klein mogelijk gehouden worden door in de urine de verandering van het U.-geen in U. te voorkomen, door het bewaren in een donkere flesch, zooals dit bij de techniek besproken is.

Terwijl dus het *quantitatief verloopen der reductie* nog onzeker is, kunnen andere vragen omtrent de juistheid der beschreven werkwijze meer positief beantwoord worden:

a. *Wordt er aan het ferro-neerslag U. of U.-geen geadsorbeerd?*

160 c.M.^{3} urine + 40 ijzer + 40 loog, 24 uur laten staan.

A. 50 c.M.^{3} der goed gemengde reductievloeistof gefiltreerd; 20 c.M.^{3} filtraat geëxtraheerd met 40 aether; met 30 c.M.^{3} aetherextract de aldehydreactie uitgevoerd, eindvloeistof tot 200 c.M.^{3} Colorimeter op 47= 0.59 E. De urine bevatte dus 1.5 x 2 x $^{200}/_{30}$ x 0.59 = 11.8 E.

B. 50 c.M.^{3} der zelfde, goed gemengde reductievloeistof. *Het neerslag werd met 14 c.M.^{3} 20 % wijnsteenzuur tot oplossing gebracht.* (spectroscopisch geen U.); 20 c.M.^{3} dezer oplossing werden als boven verwerkt; eindvloeistof tot 150 c.M.^{3} Colorimeter 45 = 0.61 E. De urine bevatte dus 1.5 x $^{64}/_{30}$ x 2 x $^{150}/_{30}$ x 0.61 E. = 11.7 E.

Het ferro-neerslag adsorbeert geen U. of U.-geen.

b. *Is de eenmalige extractie met aether van het reductiefiltraat voldoende om het U.-geen op te nemen?*

200 c.M.^{3} urine gereduceerd met 50 ijzer en 50 loog; 100 reductiefiltraat uitgeschud met 200 aether; 20 c.M.^{3} extract voor de aldehydreactie; eindvloeistof tot 80; colorimeter 41 = 0.66 E.

De urine had dus op grond der eerste extractie een U.-geen concentratie van 1.5 x 2 x $^{80}/_{20}$ x 0.66 E.

Bij de 2de extractie werden 75 c.M.^{3} opnieuw met 150 c.M.^{3} aether uitgeschud; 20 c.M.^{3} van dit extract voor de aldehydreactie; eindvloeistof tot 10; colorimeter 81 = 0.20 E.

De urine had dus op grond der tweede extractie een U.-geen-concentratie van 1.5 x 2 x $^{10}/_{20}$ x 0.20 E. *extra.*

Er was na de eerste extractie dus nog $\frac{0.5 \times 0.20}{4 \times 0.66}$ = 3.8% van het U.-geen in de waterige vloeistof.

De eenmalige extractie is voor klinische doeleinden voldoende.

c. *Onttrekt het herhaaldelijk uitwasschen van het aetherextract met kleine porties water daaraan U.-geen?*

200 c.M.³ urine gereduceerd met 50 ijzer en 50 loog;

100 c.M.³ filtraat geëxtraheerd met 200 aether;

100 aetherextract 4 x met telkens 10 c.M.³ water uitgeschud; het volumen van het aetherextract weer op 100 gebracht; 20 c.M.³ van dit extract voor de aldehydreactie; eindvloeistof tot 70; colorimeter 45 = 0.61 E.

Het gereinigde aetherextract had dus een U.-geen concentratie van $^{70}/_{20}$ x 0.61 = 2.13 E.

De 4 vereenigde waterige extracten (40 c.M.³) werden met 40 aether geëxtraheerd en deze aether in zijn geheel aan de aldehydreactie onderworpen. Eindvloeistof tot 8; colorimeter 72 = 0.3 E.

Het waterig extract had dus een concentratie van $^{8}/_{40}$ x 0.3 = 0.06 E.

Aan het ongereinigde aetherextract was dus een concentratie van $^{40}/_{100}$ x 0.06 = 0.024 E. door het wasschen onttrokken, d.i. $\frac{0.024}{2.13 + 0.024} = 1.1\ ^{0}/_{0}$.

Door het wasschen van het aetherextract gaat dus geen noemenswaardige hoeveelheid U.-geen verloren.

d. Wordt door de beschreven wijze van uitvoering der Ehrlich'sche aldehydreactie *het U.-geen quantitatief in het paarse condensatieproduct overgevoerd?*

Dit is niet te bewijzen. Want noch het U.-geen noch het eindproduct zijn in zuiveren toestand te verkrijgen. Ik heb dus zorgvuldig gezocht naar de voorwaarden, waaronder een *maximale* en tegelijk in parallelbepalingen *constante* opbrengst aan kleurstof verkregen werd, die door den graad van verdunning van het aetherextract binnen wijde grenzen niet beïnvloed werd. Dit leidde tot het op blz. 40 en 41 gegeven voorschrift, waarvan men niet moet afwijken, daar er dan

verlies ontstaat door verandering van U.-geen in urobiline. Met het oog op dit laatste zijn vooral belangrijk: 1e. het gebruik van goed gereinigden aether voor de extractie en voor het oplossen van het aldehyd; 2e. het goed wasschen van het aetherextract; 3e. het spoedig verwerken ervan buiten het zonlicht; 4e. het onmiddellijk beginnen met krachtig schudden na de zoutzuurtoevoeging; 5e. het onmiddellijk toevoegen van het gereedstaande natriumacetaat na het schudden.

Een zwakke schaduw op de urobilineplaats in het spectrum is vaak niet te vermijden.

e. *Kan het salicylzuur zonder schade voor de uitkomst als urineantisepticum gebruikt worden?*

Van een urine werd de reductie ingezet:

a. onmiddellijk nadat aan haar 1 c.M.^{3} eener verzadigde alcoholische oplossing van salicylzuur per 200 c.M.^{3} urine was toegevoegd: 4.5 E.

b. zonder salicylzuur: 4.7 E.

Nadat beide urines 24 uur in het donker gestaan hadden, werd nogmaals van haar de reductie ingezet:

a. met salicylzuur 3.55 E.

b. zonder salicylzuur 3.65 E.

Het salicylzuur kan zonder bezwaar gebruikt worden.

VIERDE HOOFDSTUK.

De quantitatieve bepaling van urobiline + urobilinogeen in de faeces.

De beteekenis van de quantitatieve urobilinebepaling in de ontlasting, die grooter is dan die van de urine, heeft men eerst zeer laat ingezien. Wij zagen in de inleiding, dat het Eppinger was, die dit onderzoek aanwees als een zeer belangrijk hulpmiddel tot het verkrijgen van een inzicht in de haemoglobinestofwisseling.

Toch heeft het ook in vroegere jaren niet aan pogingen ontbroken, om naast de urobilineuitscheiding in de urine ook die in de ontlasting te meten. De eerste stap op dien weg zette Gerhardt in zijn proefschrift. Zijn extractiemethode was nog zeer primitief, n.l. eenvoudig met water. Na filtratie sloeg hij de galkleurstof neer met baryt, verzadigde het filtraat met ammoniumsulfaat en extraheerde dit neerslag met zuren alcohol.

In het extract geschiedde dan de bepaling spectrofotometrisch volgens Vierordt. Een bezwaar der methode was de onvoldoende verwijdering der galkleurstoffen, die dus het spectrum mede verduisterden ongeveer op dezelfde plaats als het urobiline.

In beginsel veel juister was de werkwijze van onzen landgenoot A. A. Ladage, in diens uitmuntend proefschrift (1899) beschreven. Hij verzamelde de ontlasting van 24 uur, wreef alles fijn met zwak ammoniakaal water tot een zeer dunne brijige massa van ongeveer 3 Liter. Aan

het tiende gedeelte dezer suspensie voegde hij 10 druppels joodtinctuur toe (hij vermeldt niet hoe sterk, waarschijnlijk dus de officineele 10 pCt.), filtreerde, extraheerde de filterrest nog eens met ammoniakaal water en filtreerde weer. Het filtraat bevatte nu het U. in alkalische oplossing, terwijl in het teruggeblevene slechts zeer geringe sporen der stof aantoonbaar waren. De aanwezige galkleurstoffen losten bijna niet op in het water. Het filtraat werd nu zuur gemaakt met azijnzuur, waarna de vloeistof met ammoniumsulfaat verzadigd en het afgescheiden U. onmiddellijk met zoutzuurhoudenden chloroform (zie urine) uitgeschud werd (vermoedelijk 100 chloroform op 200 extract). De U.-concentratie in den chloroform werd, als bij de bepaling in de urine, volgens de methode van Saillet vastgesteld, dus door de oplossing met absolalcohol zóólang te verdunnen, totdat de absorptiestreep van het U. in zure oplossing in een laagdikte van 15 m.M. nog juist even te zien was.

Ladage onderzocht met zijn werkwijzen de U.-uitscheiding langs urine en faeces bij eenige patienten met leverziekten. Zijn methode voor de faeces is, evenals die van Gerhardt, waard, aan de vergetelheid, waarin zij dreigen te verzinken, ontrukt te worden. Het bezwaar tegen de methoden Saillet en Ladage is m.i. de nadeelige invloed van het minerale zuur op de absorptieverhouding van het U. Voorts moet Saillet voor zijn standaardbepalingen wel zeer sterk beschadigd U. in handen gehad hebben. Anders is zijn opgave, dat het „spectre minimum" ligt bij 1 mgr. per 22 cM.^{3} vloeistof, niet te verklaren.

Eppinger noemt in zijn boek als eerste quantitatieve bepaling in de faeces die van Zoja, die ongeveer dezelfde is als die van Grimbert, maar die beide eerst 12 jaren na Ladage, n.l. in 1911, medegedeeld werden. Deze werkwijzen waren om meer dan één reden niet nauwkeurig. De extractie geschiedde met chloroform, wat zeker niet quantitatief gaat, de oxydatie werd uitgevoerd met $HNO_3 + HNO_2$, een gevaarlijk middel voor het U. (soms ook met joodtinctuur). Het extract werd helder gemaakt met alcohol en door Grim-

bert nog tot koken verhit, om 't U.-geen sneller in U. om te zetten (gevaarlijk). Nu werd verdund met alcohol tot „spectre-minimum" of wel totdat de ringproef met de oplossing van Nencki (aan een 1 pCt. chloorzinkoplossing in alcohol zooveel ammoniak toevoegen tot 't ontstaande neerslag weer opgelost is) nog juist positief uitviel, de groene fluorescentie boven den chloroform dus nog even te zien was.

Auché extraheerde in 1909 de faeces met alcohol, verwijderde vreemde kleurstoffen met ligroïne en bepaalde op een origineele wijze het U.-gehalte van het extract. Hij maakte daarbij gebruik van het absorptiespectrum van kaliumpermanganaat, dat uit 5 banden bestaat, waarvan hij de 3 middelste gebruikte. Van deze zijn de eerste en tweede even sterk, de derde, *die ligt op de plaats van het urobiline*, zwakker. Hij plaatste nu vóór een $KMnO_4$ oplossing van bepaalde sterkte de te onderzoeken U.-oplossing, die hij zóólang verdunde, tot dat de 3 absorptiebanden even donker waren, wat natuurlijk bij een bepaalde, voor de geheele opstelling constante en met een oplossing van afgewogen U. meetbare concentratie der stof het geval is.

Descomps trok met amylalcohol uit en liet het extract druppelsgewijs vallen in een alcoholische oplossing van zinkvalerianaat, tot de fluorescentie verscheen. Als standaard deed een oplossing van U. uit den handel dienst.

Goiffon extraheerde met water. Aan het extract voegde hij verzadigde sublimaatoplossing toe en daarna NH_3. Hierdoor ontstaat een neerslag, maar een roode kleurstof, die G. als het stercobilinaat van kwik beschouwt, blijft in oplossing. De ontstane kleur vergeleek hij met die van een oplossing van kobaltchloride van bekende sterkte.

Adler trachtte in 1922, door de faeces te wrijven met petr. aether of ligroïne, deze eerst van het indol en skatol te ontdoen, waarbij hij in dezen petr.-aether met Schlesinger's reagens op die lichamen reageerde. Zoodoende begon hij zijn werkwijze met twee kapitale fouten, de eerste, dat hij de ontlasting zonder meer, dus zonder haar alkalisch te maken, met petr.-aether of ligroïne uit-

trok, waarbij onvermijdelijk veel urobilinogeen in deze extractiemiddelen moet overgaan, welke fout hij door een tweede nog verzwaarde, n.l. door als indicator voor de afgeloopen indolextractie de afgeloopen Schlesinger-reactie van den petr. aether te nemen. A. haalt hier Schlesinger's en Ehrlich's reactie door elkaar. Wij kunnen er wel zeker van zijn, dat, al werkende volgens zijn voorschrift, het meeste U.-geen aan de bepaling ontsnapt, terwijl de algeheele verwijdering der indolachtige lichamen niet vaststaat.

Nadat Charnas voor de urine duidelijk gemaakt had, dat de quantitatieve U.bepaling moest leiden over het U.-geen, hebben Brugsch en Retzlaff in 1912 en Flatow en Brünell in 1913 ook voor de faeces dezen weg gevolgd. Zij extraheeren de met ammon. carb. alkalisch gemaakte faeces eerst met ligroïne, om daaruit het indol en het skatol, die beide de Ehrlichsche aldehydreactie geven, te verwijderen, zuren dan aan met wijnsteenzuur en extraheeren het U.-geen met azijnaether. Deze oplossing wordt dan volgens Charnas met aldehyd en sterk zoutzuur geschud en de kleur der eindvloeistof met een standaard vergeleken, die bij B. en R. bordeauxrood, bij F. en B. een soda-alkalische phenolphtaleïne-oplossing is.

Charnas zelf heeft in 1913 voor Eppinger een quantitatieve U.-bepaling in de faeces uitgewerkt. Hij liet de 24 urige faeces bewaren in een flesch met zwart papier omkleed, terwijl de bewerking zoo spoedig mogelijk geschiedde. Bij kunstlicht werd het materiaal gewogen, goed gemengd en 10 gram in een schaal afgewogen en samengewreven met warmen 1% wijnsteenzuren alcohol van 95 pCt. De suspensie werd in een kolf van ongeveer 300 c.M.^{3} op een waterbad voorzichtig gedurende één minuut gekookt en dan snel door middel van een gereedstaand zuigfilter gefiltreerd, waarna de massa op het filter met wijnsteenzuren alcohol werd nagewasschen, tot een proefje van het filtraat geen aldehydreactie meer gaf. Het gezamenlijk volumen was gewoonlijk niet meer dan 150 c.M.^{3} Hierbij kwam een gelijk volumen 20 pCt. ammoniumsulfaatoplossing, dan natronloog, tot goed alkalische reactie, waarna *eerst*, om

het indol en skatol en andere stoffen te verwijderen, met 250—300 c.M.^{3} gereinigden aether *alkalisch*, en *daarna*, na aanzuren met wijnsteenzuur, met een gelijke hoeveelheid aether *zuur* uitgeschud werd, ditmaal om het urobilinogeen te extraheeren. Dit aetherextract werd eenige malen met kleine porties water gewasschen en dan met alkalivrij (!) natriumsulfaat vluchtig gedroogd. Van het extract werden 10 of 20 ccm. na toevoegen van wat droog dimethylamidobenzaldehyd op het waterbad tot ongeveer 1 c.M.^{3} ingedampt. Hierbij kwamen 3 à 4 druppels HCl. Sg. 1.19, die hij onder omzwenken even liet inwerken. De ontstane roode kleurstof werd opgenomen in alcohol. De oplossing mocht slechts één absorptieband, n.l. 550—570 hebben; de concentratie werd spectrofotometrisch bepaald, waarbij C. als absorptieverhouding 0.00001 neemt in plaats van 0.000009, en wel omdat er door de bewerking steeds wat U.-geen in U. overgaat, welk verlies hij op 10 pCt. schat.

Eppinger en Charnas vonden met deze methode in de faeces van normale personen gemiddeld 130 mgr. U. per dag .

Alle „urobilinogeenmethodes" voor de faeces, zoowel die van Brugsch en Retzlaff, van Flatow en Brünell, als die van Charnas zelf, hadden het bezwaar, dat zij het natieve urobiline der faeces verwaarloosden. Dit was onvermijdelijk door het ontbreken eener goede reductiemethode. (Charnas schijnt zijn biologische reductie voor de faeces niet te gebruiken). De „urobilinemethodes", die wèl beide stoffen aan de reactie konden laten deelnemen, kregen hierdoor een voorsprong. Of de fout bij de U.-geenmethodes groot was, hing o.a. dus ervan af, of naast het U.-geen veel U. aanwezig was. Vandaar ook de raad van Charnas, het materiaal donker te bewaren en zoo spoedig mogelijk te verwerken. Desniettemin kunnen, zooals Eppinger vertelt, groote fouten ontstaan, als de ontlasting diarrhoisch is of in zure gisting verkeert of wel door onbekende redenen reeds bij het deponeeren veel U. bevat. In het algemeen gesproken, is het wel juist, dat in de versch gedeponeerde faeces alleen of bijna alleen U.-geen

voorkomt, maar men moet er rekening mede houden, dat hiervan soms zelfs zeer groote afwijkingen kunnen voorkomen, zoodat men het natieve U. bij de quantitatieve bepaling niet mag verwaarloozen.

Het was daarom een verdienstelijke en op zich zelf staande poging van Wilbur en Addis, om beide stoffen elk afzonderlijk te willen bepalen.

W. en A., van wie wij in het 2de hoofdstuk gezien hebben, dat zij ons omtrent de buitengewone kwetsbaarheid van het U. onder allerlei omstandigheden onderricht hebben, reinigden bij hun methode het U. daarom in het geheel niet. Zij maakten een waterige suspensie der faeces, voegden hieraan 3 x zooveel zoutzure alcohol (alcoh. 64, HCl. 1.19, 1 c.M.^{3}, aq. 32) toe, schudden gedurende een half uur goed door, mengden dan met een gelijk vol. van het reagens van Schlesinger en filtreerden af. Het filtraat bevatte nu naast elkaar het U. en het U.-geen. In dit filtraat wekten zij de Ehrlich'sche aldehydreactie op en gingen de eindvloeistof verdunnen, eerst tot de absorptieband van het urobilinezink, en daarna verder, totdat die van het Ehrlich'sche condensatieproduct nog slechts even te zien was. Op grond van deze verdunningen berekenden zij de twee concentraties, telden deze bij elkaar op en drukten het resultaat in „units" uit. Het gelukte mij niet hun mededeeling zelve in handen te krijgen, zoodat ik voor de beschrijving aangewezen was op J. C. Todd's Clinical Diagnosis (Saunders Company, Philadelphia and London, 1923). Het is echter wel duidelijk, dat W. en A. zich om het indol en skatol als bron v. fouten bij hun werkwijze niet bekommeren.

Een uitvoeriger kritiek op de verschillende extractiemethoden van U. en U.-geen uit de faeces hebben Brulé en Garban geleverd. Wat aan van Leersum reeds in hoofdzaak bekend was, dat men na uitputtende extractie met azijnaether nog veel U.-geen kan uittrekken met behulp van 5 pCt. kaliloog, werd door hen uitvoerig bevestigd. Bij behandeling der f. met de beste oplosmiddelen voor het U., (chloroform, thymol-chloroform, amylalcohol, azijnaether, 90 pCt. alcohol, zoutzure alcohol), alléén of na elkaar ge-

combineerd gebruikt, was toch nooit een uitputtende extractie mogelijk, zoodat 5 pCt. natronloog steeds nog veel U. aan de extractierest kon onttrekken. Ditzelfde was ook het geval met de „uitgeputte" extractierest, die volgens de werkwijzen van Brugsch en Retzlaff, Flatow en Brünell, Wilbur en Addis, Auché, Descomps, Goiffon verkregen was (Charnas wordt niet genoemd). Behalve op de slechte extractie, die Brulé een principieele fout van alle bestaande werkwijzen noemt, maakt hij ook aanmerking op het verwijderen van de indolachtige lichamen met petr. aether of ligroine, die daarbij tegelijk een groot deel van het U.-geen en het U. kunnen medenemen. Hierbij schijnen onzuiverheden, vetten en dergel., die door die oplosmiddelen mede geëxtraheerd worden, een rol te spelen. Daar nu evenwel het zich los maken van het indol en het skatol, die een zoo sterke aldehydreactie geven, absoluut noodig is voor een colorimetrische quant. bepaling op den grondslag der aldehydreactie van het U.-geen, wanhoopt B. aan de mogelijkheid van zulk een bepaling: „La question reste à peu près insoluble".

Een ander gewichtig bezwaar tegen de quant.bepaling in de faeces zoekt Brulé in het verloren gaan van U. in het darmkanaal, hetzij doordat de reductie van het bilirubine andere wegen inslaat, hetzij doordat secundair eruit andere kleurstoffen ontstaan, die de typische U. of U.-geen-reacties niet meer vertoonen. Hij geeft ons hiervoor twee argumenten. Het eerste is, dat bij het bewaren van normale faeces aan de lucht het U. verdwijnt, waarbij het materiaal donkerder van tint wordt, het tweede, dat bij eenzelfde individu de hoeveelheid U, die men in de faeces, afkomstig van een periode van constipatie, vindt, veel kleiner is, dan die van tijdvak van normale ontlasting, terwijl het tekort niet gecompenseerd wordt door een surplus op de dagen, die op de constipatie volgen.

Na het voorloopig gunstig resultaat der eerste reducties van urobilinerijke urines met ferrohydroxyde in alkalisch millieu meende ik reeds onmiddellijk tot de toepassing ervan op de faeces te kunnen overgaan. Ik extraheerde de faeces met

behulp van warmen wijnsteenzuren alcohol + amylalcohol, onttrok aan dit extract het U. en het U.-geen met zeer verdunde natronloog, waarbij het indol en het skatol in het alcoholmengsel terugbleven. In het alkalische water trachtte ik nu de reductie tot stand te brengen met Mohr's zout en natronloog, moest nu evenwel ervaren, dat de reductie niet zoo vlot verliep als in de urine. Urobiline, dat ik volgens de oudere methoden zoo zuiver mogelijk bereid had uit faeces en uit urine, gaf zelfs bij de gemelde reductie in het geheel geen U.-geen. Toen ik hieruit begreep, dat de zaak niet zoo eenvoudig was, als zij zich na de eerste gunstige proeven met de urine liet aanzien, heb ik het faecesonderzoek voorloopig laten rusten en ben tot de urine teruggekeerd, om hieraan eerst het materiaal beter te leeren kennen en de werkwijze in haar phasen, zooals die bij de bepaling in de urine beschreven zijn, te leeren beheerschen. Toen ik hiermede gereed was en inmiddels van de studie van Brulé over de verschillende extractiemiddelen van het U.-geen der faeces kennis genomen had, was het mij duidelijk, dat de door van Leersum aangegeven en door Brulé met zooveel nadruk besproken extractie met 5 pCt. natronloog uitmuntend paste in het kader van mijn werkwijze, die in staat moest zijn de faeces zonder eenige vóórbewerking tegelijk te extraheeren en te reduceeren. Dit vermoeden bleek juist te zijn en de allereerste poging voor de nieuwe methode in de faeces slaagde, zoodat de werkwijze daarna niet meer veranderd behoefde te worden. Wat de verwijdering van het indol en het skatol betreft, tot nu toe dè groote moeilijkheid bij de bepaling in de faeces, kwam een toevallige waarneming, die ik bij het urineonderzoek gedaan had, mij uitstekend te pas. Ik had toen n.l. een urobilinerijke urine noodig voor het opzoeken der voorwaarden voor het quantitatief verloopen der aldehydreactie van het aetherextract der gereduceerde urine. Er was evenwel op dat oogenblik geen patient, die een dergelijke urine produceerde. Wèl was er nog zulk een urine van ongeveer een maand oud, in een gesloten stopflesch bewaard, weliswaar erg stinkend, maar nog een zeer sterke aldehydreactie vertoonend.

Ik deed met die urine de gewenschte serie proeven, merkte daarbij evenwel twee niet verwachte feiten op, 1e dat het condensatieproduct veel ongevoeliger voor sterk zoutzuur bleek te zijn, dan ik aanvankelijk gemeend had, en 2e. dat het daarentegen niet bestand bleek te zijn tegen natriumacetaat, in voldoende hoeveelheid toegevoegd, om al het zoutzuur in azijnzuur over te voeren. En toen ik, hierdoor achterdochtig geworden, het uitgangsmateriaal met Schlesinger onderzocht, bleek er ook zelfs na jodium-toevoeging, geen spoor van het oorspronkelijk zoo overvloedige urobiline meer aantoonbaar te zijn. Ik had dus met het aldehyd niet op U.-geen, maar op indol of skatol gereageerd (stinkende urine). Lost men n.l. een spoor van een dezer stoffen (ik gebruikte de praeparaten van Merck) in aether op en behandelt men deze oplossing, zooals ik dat bij de U.geen-bepaling in de urine beschreven heb, met aldehyd en sterk zoutzuur en later wat water, dan ontstaat een waterige oplossing, die voor het indol dezelfde kleur heeft als voor het U.-geen, voor het skatol een meer blauwe tint bezit. Deze oplossing heeft een absorptieband ongeveer op dezelfde plaats als het U.-geen, maar bovendien, in sterkere concentraties, ook nog een zwakkeren band bij 520—535. Maar, in tegenstelling met het U.-geen, kan men het sterke zoutzuur zeer langen tijd met het reactieproduct in aanraking laten, zonder dat dit verandert, ja, zelfs blijkt de aanwezigheid van het minerale zuur hier absoluut noodzakelijk te zijn voor het oplosbaar blijven der kleurstof in het water, daar deze zich na de toevoeging van geconcentreerd natriumacetaat aan de gekleurde waterige vloeistof noch in het water noch in den aether bevindt, maar als een dun bruin laagje onoplosbare stof op het grensvlak der twee vloeistoffen drijft.

Deze waarneming was natuurlijk van het grootste belang voor de quantitatieve bepaling van het U.-geen der faeces op grond van de aldehydreactie. Want de lastige indollichamen, die tot zelfs in het spectrum van hun aldehydproduct zoo op het U.-geen geleken, konden zoodoende rustig in de extracten blijven, daar zij aan het slot der

bewerking, bij de toevoeging van het natriumacetaat, tóch spoorloos verdwenen. *De quantitatieve bepaling in de faeces*, verkrijgt hierdoor een zeer eenvoudige gedaante, eenvoudiger nog dan die die in de urine. Zij wordt *als volgt uitgevoerd:*

Verzamel de 24-urige faeces en bewaar ze tot de verwerking in het donker. Weeg het materiaal, maak het door zorgvuldig kneden en roeren in een groot mortier of schaal goed homogeen en weeg dan 5 grammen af. Breng deze in een mortier en voeg onder voortdurend goed kneden en roeren 50 c.M.^{3} gedest. water toe, waarbij men er voor zorgt, aanvankelijk slechts zoo weinig water te gebruiken, als voor het verkrijgen van een zeer homogene dun-zalfachtige consistentie noodig is. De fijne verdeeling der massa is een essentieel deel van het werk. Bij de waterige suspensie giet men nu 50 cM.^{3} eener versch bereide 16 pCt. oplossing van Mohr's zout en daarna in een dun straaltje (uit een pipet) onder voortdurend flink roeren nog 50 cM.^{3} 12 pCt. natronloog. Als bij de urine, ook hier dadelijk overschenken in een flesch of meetcylinder, die geheel, dus zonder luchtbel, gevuld, met den stop in de vloeistof, in het donker tot den volgenden dag weggezet wordt. Dan spectroscopisch controleeren, of de reductie goed verloopen is en filtreeren in een bruin fleschje. Men brengt met een nauwkeurige pipet (ik nam er steeds een van het Staatsprüfamt für Glasgeräte, Ilmenau) 2 cM.^{3} van het filtraat in een schoonen scheitrechter, maakt sterk zuur met 20 pCt. wijnsteenzuur (0.5 à 1 cM.^{3}) en schudt uit met 20 c cm. gereinigden aether. 10 cM.^{3} van dit aetherextract brengt men in een nieuwen scheitrechter, voegt 3 ccm. eener verzadigde oplossing van het aldehyd in gereinigden aether en 10 druppels zoutzuur toe en schudt onmiddellijk(!) gedurende 1½ minuut krachtig door, waarna men een scheutje gedest. water erbij spuit, even doorschudt en nu 3 cM.^{3} verzadigde natriumacetaat-oplossing, die tevoren klaargezet zijn, toevoegt en opnieuw doorschudt. De overmaat van het aldehyd, die eerst gedeeltelijk in de sterk zoutzure vloeistof was overgegaan, scheidt zich door

het natriumacetaat als een witte wolk af, die bij doorschudden weder in den aether overgaat.

Na het aftappen der paars gekleurde vloeistof in een maatglas voegt men opnieuw 5 druppels HCl aan den aether toe, herhaalt het schudden, enz., waarbij men slechts 1.5 cM.^{3} natr. acetaat gebruikt. Een derde behandeling van den aether is bijna nooit noodig.

Men ziet dus, dat het aetherextract niet, als bij de urine, met water behoeft gereinigd te worden.

De gezamenlijke paarse oplossing verdunt en bepaalt men op de wijze, zooals bij de urine beschreven is.

Bij de berekening van het eindresultaat is het slechts noodig de verschillende verdunningen te overzien. Is de eindvloeistof tot 25 cM.^{3} verdund geworden, dan bedroegen de verdunningen:

van de faeces op het reductiefiltraat 5 : 150 = 30 maal;

„ het reductiefiltraat op het aetherextract 2 : 20 = 10 maal;

„ het aetherextract op de eindvloeistof 10 : 25 = 2.5 maal.

Was blijkens de aflezing en de correctiecurve van den colorimeter de kleurintensiteit der vloeistof in de cuvet b.v. 75 pCt. van die der standaardoplossing in de wig, dan was de urobilineconcentratie der faeces gelijk aan 30 x 10 x 2.5 x 0.75 = 562.5 eenheden, waarbij een eenheid een hoeveelheid urobiline vertegenwoordigt van 0.4 mgr. per 100 gr. faeces.

Was er dien dag 250 gram faeces, dan bevatten deze dus 2.5 x 562.5 x 0.4 = 562.5 mgr. urobiline.

Na de opmerkingen van Brulé over de gebrekkigheid der extractiemethoden voor de faeces en de superioriteit van de verdunde loog voor dat doel, komt vanzelf de vraag naar voren, of de door mij gevolgde extractie met NaOH àl het U. en U.-geen aan de faeces onttrekt.

Vijf gram U.-rijke faeces, die eenigen tijd aan het licht blootgesteld waren geweest, werden op de gewone wijze gereduceerd. Van de troebele reductievloeistof werden 100 cM.^{3} afgemeten en gefiltreerd. Van het filtraat

werden 50 cM.³ apart opgevangen en bepaald: de concentratie was 31 E.

De rest werd op hetzelfde filter afgefiltreerd en op het filter zoo lang waschwater gegoten, tot er geen U. geen meer doorliep (aldehydreactie).

Het volumen van dit filtraat en waschwater was 170 cM.³ De concentratie aan U.geen erin was 6.24 E. Neemt men in aanmerking, dat deze 170 cM.³ overeenkwamen met pl.m. 50 ccm. reductiefiltraat, dan laat zich voor dit laatste hieruit een concentratie van $^{170}/_{50}$x6.24=21.2 E. berekenen, dat is dus minder dan in de eerste 50 cM.³ filtraat (het U.geen was door de lange filtratie gedeeltelijk in U. veranderd). Door het wasschen was aan de faeces-partikels dus, behalve het reeds door de NaOH geextraheerde, geen U.-geen meer onttrokken.

De filterrest werd nu opnieuw in water gesuspendeerd en deze suspensie weder met ijzer en loog gereduceerd. Het reductiefiltraat hiervan was vrij van U.geen.

De filterrest dezer tweede reductie werd nu geextraheerd, zoowel koud als warm, met zoutzuur- en met zwavelzuurhoudenden alcohol. Er was geen urobiline in aantoonbaar.

Ik meen dan ook, dat men de beschreven wijze van extractie veilig als een uitputtende beschouwen mag.

Tenslotte is op de beschreven werkwijze nog deze critiek mogelijk, dat weliswaar het indol en het skatol daarbij niet meer aan de aldehydreactie debet zijn, maar dat dit nog wel het geval kan zijn met andere, hypothetische stoffen, waarvan het reactieproduct zich niet met natriumacetaat ontkleurt. Of dit het geval is, weet ik nog niet. Zulke stoffen zouden, evenals het U., derivaten van het bilirubine kunnen zijn, in welk geval men natuurlijk beter zou doen, haar mede te bepalen, dan te trachten haar van het U.geen te scheiden.

VIJFDE HOOFDSTUK.

Een nieuw urobilinepraeparaat en zijn eigenschappen.

In het 3e hoofdstuk werd beschreven, hoe men uit het petroleumaetherextract van het reductiefiltraat eener aan urobiline rijke urine urobiline afscheiden kan door dit extract, dat alleen urobilinogeen bevat, gedurende eenige dagen aan licht en lucht bloot te stellen, waarbij het urobiline zich als een uiterst fijn, „onvoelbaar", poeder afscheidt, zonder a.h.w. opgelost geweest te zijn. Deze werkwijze kan men ook gebruiken, om die stof op grootere schaal dan dit tot dusver mogelijk was, uit faeces, die immers zooveel meer ervan bevatten dan de urine, te bereiden. Het is zoodoende mogelijk, indien men geregeld te beschikken heeft over de ontlasting van een patient met flinken bloedafbraak, liefst iemand met een haemolytischen icterus, het U. gramsgewijze te verzamelen.

Het recept voor deze bereiding luidt dan:

100 gram faeces worden met 500 cM.^{3} gedest. water goed fijngewreven, waarna men er 500 cM.^{3} 16 pCt. oplossing van Mohr's zout en, langzaam, onder roeren, 500 cM.^{3} 12 pCt. natronloog bij laat vloeien. In een geheel gevulde flesch tot den volgenden dag in het donker wegzetten. Filtreeren. Aan het filtraat onder voortdurend schudden zooveel 25 pCt. HCl toevoegen, dat de reactie nog alkalisch blijft (vooraf aan een kleine portie titreeren). De vloeistof in een grooten scheitrechter brengen met het dubbele volumen petrol. aether. Eerst nu sterk aanzuren

met 20 pCt. wijnsteenzuur en onmiddellijk krachtig schudden. De lagen scheiden en dan de waterige vloeistof nog eens met het dubbele volumen petr. aether uitschudden. De vereenigde petrol. aether-extracten 3 x wasschen met kleine porties gedest. water en dan drogen met Cloorcalcium (niet alkalisch!) of magnesiumsulfaat (idem). Het afgefiltreerde extract in het donker afdestilleeren tot pl.m. ¾ Liter.

Dit extract wordt nu gereinigd door:

1e. het 2 x met 25 cM.³ N/10 NaOH uit te schudden, waarin het U.geen overgaat,

2e. deze oplossing 2 x met veel petr. aether uit te schudden om indolachtige lichamen te verwijderen,

3e. dan haar aan te zuren met wijnsteenzuur en opnieuw met veel petr. aether uit te schudden, waarin het U.geen weder overgaat,

4e. dit extract 3 x met kleine porties water uit te wasschen, te drogen met $CaCl_2$ of $MgSO_4$ en te filtreeren.

Dit kleurlooze waterheldere extract wordt nu in gedempt daglicht in een gesloten kolf zóó lang bewaard, totdat het oranje urobiline op den bodem ligt, de bovenstaande vloeistof weder geheel helder geworden is en een proefje ervan met aether, aldehyd en zoutzuur geen aldehydreactie meer geeft.

Het afgescheiden U. filtreert men op een gehard filter af, wascht het op het filter met petr. aether en bewaart het in een bruine flesch.

Het langs dezen weg verkregen poeder is oranjerood, niet hygroscopisch, amorf. Een begin van kristallisatie heb ik verkregen, evenwel nog niet het geheel tot kristalliseeren gebracht.

Het smeltpunt ligt opvallend laag, n.l. bij 99° C. Het is opmerkelijk, dat reeds bij zeer lage temperatuur, ongeveer 45° C., de stof haar oranjeroode kleur verliest, zwart wordt en op een klein volumen samentrekt. Het onderstuk van de smeltpuntcapillair werd na de verwarming tot 100° C. afgesneden en fijngewreven in een mortier, waarna het U. in alcohol werd opgelost. Toevoeging

van het reagens van Schlesinger gaf nu een zeer sterke fluorescentie en een zeer zwaren absorptieband, zoodat, ondanks het veranderde uiterlijk der stof, deze toch niet diepgaand ontleed kan zijn.

Prof. Holleman was zoo vriendelijk, op zijn laboratorium de elementairanalyse en de moleculairgewicht-bepaling der stof te doen uitvoeren.*) Zij gaf het volgende resultaat:

0.1530 gram der stof gaven 0.3618 gr. CO^2 en 0.1029 gr. H^2O.

0.1027 gram der stof gaven 0.2417 gr. CO_2 en 0.0761 gr. H_2O.

Waaruit berekend: 64.19 resp. 64.49 pCt. C.
8.23 resp. 7.48 pCt. H.

0.1360 gram der stof gaven 10.8 cM.^{3} N_2; temp. 16° Bar. 766.6

0.1124 gram der stof gaven 8.6 cM.^{3} N_2; temp. 15.8° Bar. 766.6

Waaruit berekend: 9.30 resp. 8.95 pCt. N.

De stof bevatte dus 64.3 pCt. C.; 7.9 pCt. H; 9.1 pCt. N; 18.7 pCt. O.

Voor zoover dit uit het geringe aantal analyses en bij de grootte van het molecule te zeggen is, passen deze cijfers bij een formule van $(C_8H_{12}NO_2)n$.

Bij het bepalen van het moleculairgewicht werd de micro-methode van Rast (Berl. Ber. 1922, *55*, 1051 en 3727) gevolgd, waarbij 0.0439 gram der stof in 0.1287 gram kamfer werden opgelost, waardoor het smeltpunt van den kamfer van 176° C. tot 158° C. daalde.

Daar de molec. depressie (1 mol. in 1 K.G.) van kamfer 40° C. bedraagt, was de concentratie van het U. dus $\frac{18}{40} = \frac{9}{20}$ mol., overeenkomende met $\frac{43.9}{0.1287}$ pro mille urobiline.

't Moleculair-gewicht is dus $\frac{20}{9} \times \frac{43.9}{0.1287} = 758$.

Daar ook bij het verwarmen der stof in den kamfer

*) Hem en den heer van der Vliet betuig ik daarvoor bij dezen mijn hartelijken dank!

zich de bovenvermelde donkere verkleuring vertoonde en bovendien bij de verschillende bepalingen, waarvan de bovenstaande de beste is, gemakkelijk ontmenging bij het afkoelen intrad, geef ik dit resultaat onder groot voorbehoud.

De stof is weinig oplosbaar in water, gemakkelijk in verdunde alkaliën of ammoniak, waaruit zij door minerale zuren gedeeltelijk weder neergeslagen wordt. De zure oplossing is donkerder van kleur dan de alkalische der zelfde concentratie. Door de oplossing met ammoniumsulfaat te verzadigen, wordt de stof geheel uitgezout. Aan het nog niet geheel droge neerslag kan men het U. met alcohol weder gemakkelijk geheel onttrekken.

Gemakkelijk lost de stof op in de alcoholen. De oplossing in aethylalcohol, die aanvankelijk niet sterk gekleurd is, wordt bij staan aan de lucht veel donkerder van tint. Goed is de oplosbaarheid verder in chloroform, aceton, pyridine, aniline, kamfer, slecht in azijnaether, glycerine, zeer slecht in gewonen aether. Onoplosbaar is zij in tetrachloorkoolstof, zwavelkoolstof, petrol. aether, ligroïne, benzol, toluol, xylol en paraff. liquidum.

Ook zonder zinkzouten fluoresceert de verdunde oplossing in azijnaether, aethylalcohol, aceton, vooral de eerste.

De waterige oplossingen der stof vertoonen slechts één absorptieband. Deze ligt voor de neutrale oplossing bij 489—505, voor de alkalische bij 510—520, voor de zure bij 489—505.

Voor het te voorschijn brengen van den z.g. E.-band van Garrod—Hopkins—Saillet was het noodig op een bepaalde wijze te werk te gaan. Lost men n.l., zooals dat voor de hand ligt, een weinig der stof in een paar druppels n/10 NaOH op, verdunt deze dan met een paar cM.^{3} water en voegt nu druppelsgewijs n/10 HCl toe, dan trekt zich zelfs bij grooten overmaat van zoutzuur het alkalische spectrum niet tot 505 terug en van een E-band is geen sprake. Beter resultaat krijgt men, als men een weinig der stof eerst met een paar c.M.^{3} water krachtig schudt, dan 1 druppel n/10 NaOH toevoegt en dan druppelsgewijs n/10 HCl. Dan wordt het alkalische spectrum door het zure

vervangen en de E.-band wordt, zwak, zichtbaar, Het beste gaat het, als men eerst de stof met een paar c.M.^{3} water krachtig schudt, waarbij een gelig-roode oplossing ontstaat, hieraan 20 druppels n/100 H_2SO_4 of HCl toevoegt, weder 1 minuut krachtig schudt, dan druppelsgewijs, onder voortdurend schudden, 30 druppels n/100 NaOH erbij doet, waar bij de vloeistof eigenaardig roodachtig wordt, vooral te zien aan de tegen de wanden opspattende vloeistof bij het schudden. De nu zichtbare absorptieband strekt zich uit tot 530, dus verder dan de gewone band van het alkalische urobiline. Voegt men nu druppelsgewijs n/100 HCl toe, dan wordt de roode kleur nog duidelijker en na 20 à 30 druppels trekt zich de absorptieband terug tot 505 en de E.-band 535—545 treedt op, tegelijk met de lichte, door Garrod, Hopkins en Saillet beschreven troebeling, die volgens de twee eersten voor den E.-band aansprakelijk is

Deze verschijnselen wijzen in de richting van twee modificaties van het U., die zich onderscheiden door het spectroscopisch gedrag hunner alkalische oplossing tegenover het aanzuren met een mineraal zuur. Het is de modificatie„ die uit mijn „neutraal' urobiline door de inwerking van minerale zuren ontstaat, welke in staat is den E.-band te geven; die, welke door de directe inwerking van alkali erop ontstaat, doet dit niet. Het is zeer waarschijnlijk de „zure" modificatie, welke zij, die zuiver U. trachten te bereiden, in handen hebben gehad, daar tijdens de verwerking der urine, hetzij bij het uitzouten met ammoniumsulfaat, hetzij bij het uitschudden met organische solventia, zuren gebruikt worden.

Hoe deze „zure" modificatie, die bij mijn alkalische extractiemethoden van urine of faeces niet ontstaan kan, zich tegenover de ferro- of de magnesiumreductie gedraagt, weet ik nog niet.

De oplossing der zinkverbinding vertoont een sterke groene fluorescentie. De vloeistof is dan bij doorvallend licht, al naar de concentratie, geelbruin of rose. De fluorescentie is aanzienlijk sterker dan van eenig ander bereid U. praeparaat. Ik bepaalde de verdunning, die zij verdroeg om

nog juist zichtbaar te zijn in het zonlicht tegen een donkeren achtergrond, op de volgende wijze:

Een kleine hoeveelheid U., die op het filter was achtergebleven na de filtratie van een belicht petrol. aetherextract, werd in alcohol opgelost, wat zeer gemakkelijk geschiedde.

1 c.M.³ dezer oplossing werd met 9 c.M.³ der verdunningsvloeistof van Adler (20 Gr. zinkacetaat, 100 c.M.³ water en 100 c.M.³ alcohol, filtreeren), verdund.

Van deze verdunning weder 1 c.M.³ + 9 Adler's vloeistof.

Van deze verdunning weder 1 c.M.³ + 9 Adler's vloeistof.

Van deze verdunning weder 1 c.M.³ + 9 Adler's vloeistof.

Het laatste dezer vier maatkolfjes gaf nog een duidelijk zichtbare fluorescentie. De grens lag bij 5 c.M.³ der laatste verdunning + 4 c.M.³ Adler's vloeistof. Deze grensverdunning gaf in een laag van 3 c.M. dikte een twijfelachtigen, in een van 10 c.M. een duidelijk zichtbaren absorptieband.

Van de alcoholische oplossing, die als uitgangsmateriaal gediend had, gaven 25 c.M.³ een verdampingsrest (kamertemperatuur) van 35.5 Mgr. De urobiline-concentratie in de grensvloeistof was dus:

$$\frac{0.0355}{1.8 \times 10^{4} \times 25} = 1 : 12 \text{ à } 13 \text{ millioen.}$$

Een herhaling der bepaling op een anderen dag met een ander praeparaat gaf 1 : 9 millioen.

De grens der fluorescentieproef ligt voor dit urobiline dus bij een concentratie van 1 mgr. op 10 Liter. Daar ligt ook de grens voor het aantoonen der stof met behulp van den absorptieband der zinkverbinding, wanneer men de laagdikte 10 c.M. (ik nam een polarimeterbuis) kiest.

Men kan uit dit U., dat zich als een zwak zuur gedraagt, gemakkelijk verschillende metaal-verbindingen bereiden. Neemt men daarvoor de waterige oplossing der stof zonder meer, dan mislukt meestal de vorming, omdat het sterkere zuurradicaal van het toegevoegde zout de reactie in omgekeerde richting doet verloopen. Neemt men daarentegen een overmaat van alkali erbij, dan slaat veelal hydroxyde of oxyde van het zware metaal mede neer. Een universeele werkwijze is deze, dat men het U. in een mortier samenwrijft met

wat magnesiumoxyde en enkele druppels water, waarbij men geleidelijk méér water toevoegt. De gebrande magnesia lost slechts zeer weinig in het water op; wat er oplost, dient voor de vorming van het oplosbare urobiline-magnesiumzout, waarna er opnieuw oxyde in oplossing gaan kan. Van het overtollige oxyde filtreert men af.

Het filtraat dient voor de bereiding der verschillende metaal-verbindingen. Zoo kreeg ik door:

Calciumchloride	geen neerslag
baryum „	gering bruin neerslag
ferrosulfaat	gering bruin neerslag
ferrichloride	geen neerslag
manganochloride	geen neerslag
nikkelsulfaat	geen neerslag
cadmiumacetaat	gering rose neerslag
cobaltonitraat	niet sterk, rood neerslag
zinkacetaat in alcohol	sterk, oranjerood neerslag
zinkchloride in water	sterk, oranjerood neerslag
cupriacetaat	sterk, paars neerslag
neutraal loodacetaat	flink, bruin neerslag
basisch loodacetaat	flink, bruin neerslag
hydrargyrichloride	flink oranje neerslag, vloestof iets rose
zilvernitraat	sterk, bloedrood neerslag
geel goudchloride	grootvlokkig, bruin neerslag
platinachloride	geen neerslag
palladiumchloride	sterk, zwartbruin neerslag
stannochloride	flink, bruinrood neerslag
thoriumnitaat	geen neerslag
uranylacetaat	flink, bruin neerslag

De cupriverbinding is niet in water, wèl in verschillende organische solventia oplosbaar: de alcoholen, aceton, chloroform. De kleur dier oplossing is een karmijnroode, met een absorptieband bij 515—533. Bereidt men de verbinding door aan een oplossing van U. in water een oplossing van cupriacetaat toe te voegen en schudt men de troebele vloeistof krachtig met chloroform, dan kleurt deze zich rood. Laat men nu evenwel het geheel rustig een paar dagen staan, dan wordt de chloroformlaag geleidelijk paarsblauw, steeds inten-

siever, en men krijgt dan een samengesteld absorptiespectrum van 3 banden, één scherp begrensde, alleen in geconcentreerde oplossingen zichtbare bij 660—685; een iets zwaardere bij 585—615; en een breede verduistering met onscherpe grenzen, die 't langst zichtbaar blijft, bij 505—545. Een verklaring van dit verschijnsel kan ik nog niet geven.

De koperverbinding is met een roodviolette kleur in alkaliën oplosbaar (*biureetreactie* van het U.). De oplossing heeft een absorptieband bij 510—525. Ook de cobaltoverbinding geeft een dergelijke biureetreactie met een absorptieband op 510—525.

Het opvallende bloedroode *zilverzout* is zóó onoplosbaar, dat na bezinken der groote vlokken de bovenstaande vloeistof geheel kleurloos wordt en spectroscopisch „schoon" is. Het lost op in ammoniak, evenwel met verdwijnen der roode kleur. In de organische solventia is het onoplosbaar.

Met het praeparaat werden verder eenige reductieproeven verricht:

1. 20 mgr. opgelost in een paar c.M.^{3} alcohol, dan met ongeveer 70 c.M.^{3} water verdund, dan 33 c.M.^{3} ferrooplossing en 33 c.M.^{3} loog toegevoegd, dan nog aq. dest. tot een volumen van 130 c.M.^{3}; xylol er bovenop om de lucht af te sluiten. Na 15 minuten de eerste portie van 10 c.M.^{3} afgefiltreerd; 5 c.M.^{3} filtraat + wijnsteenzuur + 20 c.M.^{3} aether; 10 c.M.^{3} aetherextract voor de aldehydreactie; eindvloeistof tot 100 c.M.^{3}; color. 63.

Na 45 minuten de tweede portie van 10 c.M.^{3} gefiltreerd color. 64.

Na 2 uur de derde portie: color. 57 (= 0.48 E.).

De reductie was dus spoedig op haar maximum. Op de basis van 1 E.. = O. 4 mgr. per 100 c.M^3 bevatten de totale 130 c.M.^{3} reductievloeistof dus 1.3x4x10x0.48x0.4 = 9.98 mgr., zoodat 50% teruggevonden is.

2. 20 mgr. opgelost in ± 4 c.M.^{3} alcohol; verdund met water tot 80 c.M.^{3}. Te reduceeren gezet met 20 c.M.^{3} eener suspensie van magnesiumpoeder in 1 pro mille sublimaatoplossing (na eenigen tijd staan der suspensie was de bovenstaande overtollige sublimaatoplossing zooveel mogelijk afgegoten).

De vloeistof werd in een cylinderglas in water van 50° à 60° C. geplaatst met een laag xylol er bovenop, om de lucht af te sluiten. Na 10 minuten werd de eerste portie van 10 c.M.^{3} eruit genomen en snel gefiltreerd; 5 c.M.^{3} filtraat + 5 dr. wijnsteenzuur + 20 c.M.^{3} aether; 10 c.M.^{3} extract voor de aldehydreactie; eindvloeistof tot 100 c.M.^{3}; color. 41.

Na 25 min de 2de portie; color 36.

Na 45 min. de 3de portie; color. 35.

Na 60 min. de 4de portie; color. 35.

Na 120 min. de 5de portie; color. 36 (= 0.74 E.).

Na 18 uur de 6de portie; color 53.

Wij zien dus, dat de reductie na 25 minuten op haar maximum is, wat de U.-geen vorming betreft, daarop eenigen tijd constant blijft staan, terwijl na 18 uur blijkbaar een deel van het U.-geen door te ver gaande reductie weder verdwenen is.

De maximale reductie kwam overeen met 40 x 0.74 x 0.4 = 11.9 M.gr. urobiline in de totale reductievloeistof, zoodat er ± 60 % teruggevonden is.

Een ander praeparaat, dat bij het neerslaan uit petr. aether meer licht had gehad en na de filtratie verder in een open schaal eenige dagen bewaard was, was zoowel met de ijzer- als met de magnesium-methode slecht te reduceeren; de opbrengst aan U.-geen was slechts ongeveer 15% van de berekende, terwijl het reductiefiltraat der ijzerreductie een zwaren U.-band, dat der magnesium-reductie geen U.-band vertoonde.

SAMENVATTING.

1. Uitgaande van de stelling van Charnas, dat het zoeken naar een quantitatieve bepaling van het urobiline zelf geen kans op succes heeft op grond der overgroote kwetsbaarheid dier stof en dat men een zoodanige bepaling dus zal moeten leiden over het urobilinogeen, was er voor de reductie van U. tot U.-geen een goed reductiemiddel noodig, waarvoor ferrohydroxyde in statu nascendi bleek te kunnen dienen.

2. Aan het aetherextract van de op die wijze gereduceerde urine werd nagegaan, hoe daarmede de Ehrlich'sche aldehydreactie uitgevoerd moest worden, om een maximale opbrengst aan kleurstof te verkrijgen. Het bleek daarbij o.a. noodig, aan het einde der bewerking het gebruikte zoutzuur weg te nemen met behulp van natriumacetaat.

3. De waterige oplossing der paarse kleurstof, die ten slotte verkregen was, werd colorimetrisch vergeleken met een standaard, die in navolging van Flatow en Brünell bestond uit een 0.0005% soda-alkalische phenolphtaleine oplossing Het resultaat werd daarbij in „eenheden" uitgedrukt. Door de weging van het urobiline, dat uit een petrol. aetherextract met een bekend aantal „eenheden" bereid was, kon vastgesteld worden, dat een concentratie van één „eenheid" overeenkomt met 0.4 mgr. urobiline per 100 c.M.^{3}

4. Dat de reductie met ferrohydroxyde in alkalisch milieu verloopt, maakte het voor de faeces mogelijk deze reductie met de meest werkzame extractiewijze van het U.-geen, n.l. die met verdund alkali, te combineeren, zoodat deze in één

tempo konden geschieden, waarna de verdere bewerking geheel met die der urine parallel liep.

Aan de extractierest der zóó bewerkte faeces kon op andere wijze geen U. of U.-geen meer onttrokken worden.

5. Het aan het einde der bepaling in de faeces toegevoegde natriumacetaat bleek een goed middel te zijn om de hinderlijke indollichamen kwijt te raken.

6. Een ander middel voor de reductie van zuiver U. tot U.geen werd gevonden in het metallisch magnesiumpoeder, geactiveerd met een 1 pro mille sublimaatoplossing, of ook wel zonder deze laatste. Voor de reductie van het U. in de urine was het ongeschikt, daar reoxydatie van het U.-geen tot U. te gemakkelijk intrad.

Het geactiveerde magnesiumpoeder, dat krachtig waterstof ontwikkelt in een milieu, dat blijvend slechts licht alkalisch reageert (slechte oplosbaarheid van het Mg $(OH)_2$) zal hierom wellicht in laboratorium en techniek, meer uitgebreide toepassing kunnen vinden.

7. Er werd gewezen op de groote waarde van den petroleum-aether, die een electief extractiemiddel voor U.-geen bleek te zijn. Hij neemt geen kleurstoffen op, blijft dus steeds geheel kleurloos en is het beste middel, om U.-geen van U. te scheiden. (Een middel, dat het U. aan een waterige vloeistof onttrekt en het U.-geen erin laat, bestaat niet). Voor de quantitatieve bepaling is hij evenwel om bijkomstige redenen minder geschikt dan aether en moet dezen slechts zelden vervangen.

8. De petrol. aether, die de stoffen, welke in de urine de Ehrlich'sche aldehydreactie storen, niet mede extraheert, gaf daardoor gelegenheid, voor het aantoonen van het U.-geen in de urine een nieuwe wijze van uitvoering der aldehydreactie te geven, die even snel is als de reactie van Schlesinger op U. en in het beoordeelen van de intensiteit der reactie gemakkelijker dan deze.

9. De petrol. aetherextractie maakte het verder mogelijk op een eenvoudige wijze ook de bijna vergeten eidooierreactie van Ehrlich in de kliniek in eere te herstellen, zoodat in eenzelfde extract de drie reacties: aldehydreactie van Ehrlich-

Neubauer, eidooierreactie van Ehrlich-Thomas en Schlesinger's proef snel naast elkaar uitgevoerd kunnen worden.

10. Het electief karakter der petrol. aetherextractie maakte het mogelijk, door de belichting aan de lucht van een petroleum-aether-urobilinogeen-extract van het reductiefiltraat van urine of faeces een urobiline to bereiden, dat de typische eigenschappen dezer stof in zeer veel grooter intensiteit vertoonde dan de tot nu toe bereide praeparaten. De afzondering van grootere hoeveelheden U. zonder al te veel moeite en kosten is hierdoor mogelijk gemaakt.

Een elementairanalyse der stof werd verricht; haar moleculairgewicht en haar smeltpunt bepaald. De verdunningsgrenzen voor de fluorescentieproef en de spectroscopische reactie op den absorptieband der zinkverbinding werden vastgesteld. Een rij van metaalzouten kon afgezonderd worden. De z.g. E. band van Garrod-Hopkins-Saillet kon zichtbaar gemaakt worden. De stof was gedeeltelijk reduceerbaar met de ferro- en de magnesiummethode.

LITTERATUUR.

1. Auché. C.R. d.l. Soc. de Biol. 1909, **26,** 228.
2. A. Adler, Arch. f. Klin. Med. 1922, **138,** 309.
3. Bauer, Ctrbl. f. inn. Med. 1905, **34,** 803.
   1906, H.2.
4. v. Bergmann. Volkm. Klin. Vortr., 190.
5. Beyers. Diss. Veeartsenijkund. Hoogeschool, Utrecht, 1923.
6. Bogomolow. Jahr. Ber. f. Tierchemie, 1892, blz. 536.
7. Bornträger. Zschr. f. Anal. Ch. 1881, **20,** 88.
8. Borrien. Thèse de Paris, 1911.
9. Brugsch en Retzlaff, Zschr. f. exp. Path. u. Ther, 1912, **11,** 508.
10. Brulé. Les Ictères, 3me. Ed. Masson, Paris.
11. Brulé en Garban. C.R d.l. Soc. de Biol. 1920, No. 11.
12. Clemens. Die Diazo-Reaktionen d. Harns. Hab. schrift Freiburg i. Br. 1899.
    D. Arch. f. Klin. Med. 1901, blz. 71.
13. Charnas. Bioch. Zschr. 1909, **20,** blz. 401.
14. Denigès. Journ. de Pharm. et de Chimie (6), **5**, 395, Chem. Zentr. bl. 1897, 1, 1128.
15. Descomps. Thèse de Paris, 1910.
16. Dick. Arch. f. Gynäk, 1884, No. 23, blz. 126.
17. Disqué. Zschr. f. physiol. Ch. 1878/79, **2**, 259.
18. P. Ehrlich. Maly's Jahr. ber. 1883, **13,** blz. 227.
    Med. Woche, 1901. No. 15.
    Char. Ann. 8, blz. 140.
19. Eichholz. Journ. of Physiol, 1893, **14**, blz. 326.
20. Engel en Kiener. C.R. d.l. Soc. de Biol. 1887. *IV*, 186 en 225.

21. Eppinger. Die hepatolienalen Erkrankungen 1920.
„ (Charnas). D. Zschr. f. Klin. Med. 1913, **78,** blz. 1.
22. Feist. Berl. Ber., 1902, **35,** 1647.
23. Flatow en Brünell. M. m. Wschr. 1913 blz. 234.
24. Florence. J. de Pharm. et de Ch. 1908.
25. E. Fischer. Lieb. Ann. 1887, **239,** blz. 238.
Lieb. Ann. 1887, **242,** blz. 372.
Berl. Ber. 1886, **19,** blz. 2988.
Berl. Ber. 1887, **20,** blz. 815.
26. H. Fischer. Zschr. f. physiol. Ch. 1911, **73,** blz. 204.
u.P. Meyer. 1911, **75,** blz. 339.
U. Meyer-Betz. 1911, **75,** blz. 232.
U. Meyer-Betz. 1912, **76,** blz. 330.
27. F. Fischler. Physiol. u. Path. d. Leber, Berlin, 1916.
28. Gautier en Monod. C.R. d.l. Soc. d. Biol. **66,** blz. 211.
29. Garrod. Journ. of Physiol. 1897, **21,** blz. 190.
30. Garrod en Hopkins. Journ. of Physiol, 1896, **20,** 123.
1898, **21,** 451.
31. D. Gerhardt. Ub. Hydrobilirubin. Diss. Berlin. 1889.
Zschr. f. Kl. Med. 1897, **32,** 303.
Münch. m. Woch. 1905, blz. 889.
32. Goiffon. C.R. d.l. Soc. de Biol. 1920, 24 janvier.
33. Goroduki. Ub. d. Einfl. experim. in den Körper eingeführt. Hämoglobins, u.s.w., Dorpat 1889.
34. Grigaut. C.R. d.l. Soc. de Biol. 1909, **66,** 725.
35. Grimm. Virch. Arch. 1893, **132,** 246.
36. Grossmann. Wiener. Med. W. Schr. 1912, No. 52.
37. Hammarsten. Verhandl. d. Wiss. Soc. in Upsala 1893, blz. 5 en 13, Skand. Arch. 1902, **3,** 330.
38. J. de Hartogh, Jr. Diss. Freiburg i. Br. 1897.
39. Hausmann. Deutsche med. Wschr. 1913, blz. 360.
40. Hayem en Winter, geciteerd bij Saillet.
41. Henocque, geciteerd bij Ladage.
42. Hoppe-Seyler. Berl. Ber. 1874, **7,** 1065.
Zschr. f. physiol. Ch. 1889, **13,** 117.
Virch. Arch. 1891, **124,** 30.
Zschr. f. physiol. Ch. 1891, **15,** 186.

43. Jaffé. Virch. Arch. 1862, **23.**
Virch. Arch. 1869, **47.**
Zentr. bl. f. d. Med. Wiss. 1868, 243; 1869, 177.
Jahr. ber. d. Tierchemie, 1. 230.
44. Jolles. Pfl. Arch. **61,** 623.
Ctrbl. f. Inn. Med. 1895.
45. Kimura. D. Arch. f. Klin. Med. 1904, **79,** 274.
46. Kunkel. Virch. Arch. 1880, **79,** 455.
47. A. A. Ladage. Acad. Proefschrift, Leiden, 1899.
48. v. Leersum. Ned. T. schr. v. Gen. 1899, 1, blz. 1065.
49. R. Maly, Ann. de Ch. u. Pharm, 1872, **163,** 77.
Centr. Bl. f. d. Med. Wiss. 1871, 849.
50. A. Mac Munn. Proc. Roy. Soc. **31,** 26 en 203.
Jahr. ber. f. Tierch. 1881, 211.
Berl. Ber. 1881, **14,** 1212.
J. of Physiol. 1885, **6,** 34. 1889, **10,** 73 en 95.
51. C Méhu. J. de Pharm. et de Ch. 1878, **28,** 159.
Bull. de l'Acad, de Méd. (2) **7,** 671.
52. v. Moracewski. Arch. f. Verd. Kr. 1908, **14,** 378.
53. Fr. Müller. 70ter. Jahr. ber. d. Schles. Ges. f. Vaterl. Kultur, 1892, Med. Abt. 1.
54. O. Neubauer. Sitz. ber. d. Ges. f. Morph. u. Physiol. 1903, Juli H. 2.
Ctrbl. f. inn. Med. 1905, **26,** 833.
—Huppert. Anal. d. Harns. 1910.
55. Nencki. u. Sieber. Monatsch. f. Ch. 9, 128, Arch. f. exp. Path. **24,** 442.
56. Le Nobel. Arch. d. gesamten Physiol. 1887, **40.**
57. Oppenheim. Ub. d. gelbe Diazoreaktion. Diss. Berlin, 1885.
58. Pappenheim. Münch. Med. W.schr. 1903. No. 11.
59. Peters. Ned. Tschr. v. Gen. 1918 en 1919.
60. Petri. Zschr. f. klin. Med. 1884, **7,** 500.
61. Pröscher. Zschr. f. physiol. Ch. 1901, **31,** 520.
62. Riva en Zoja. Comm. al. I. Congresso ital. di Med. Intern. 1888.
63. Rohde. Zschr. f. Physiol. Ch. 1905, **44,** 161.
64. Saillet. Revue de Med. 1897, **17,** 113.

65. Salkowski. Virch. Arch. 1887, **109,** 361.
66. Schlesinger. Deutsche Med. W. schr. 1903.
67. Ad. Schmidt. Verhandl. d. 13. Kongr. f. inn. Med. 1895, 320.
68. Schulz., in Neubauer-Huppert Analyse d. Harns, Wiesbaden, 1913.
69. Simpson, Bioch. Journal, 1911, **5,** 378.
70. Städeler. Lieb. Ann. **132,** 323, Vierteljahr. schr. d. Naturforscherges. Zürich. **8,** 1.
71. Steensma. Acad. Proefschrift, Amsterdam, 1918, Ned. T. schr. v. Gen. 1914, I No. 7.
72. Studenski. Petersb. Med. W. schr. 1893,
Maly's Jahr. ber. 1893, **23,** 588.
73. B. J. Stokvis. Zschr. f. Biol. 1897, **34,** 466.
Kühne's Festschrift, 1896.
74. K. Thomas Urobilinogen. Diss. Freiburg. i. B. 1907.
75. Vanlair en Masius. Zentr. bl. f. d. med. Wiss. 1871.
76. Viglezio. Maly's Jahr. ber. 1892, **22,** 537.
Lo Sperimentale 1891, 235.
77. Wilbur en Addis. Arch. of intern. Med. 1914, **13.**
78. Willstätter en Mieg. Lieb. Ann. **350,** 46.
79. Zoja. Fol. haemat. 1911, **12,** 1.